

Chemometrische Untersuchung flüchtiger Verbindungen
mariner *Salinispora* Bakterien

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig
zur Erlangung des Grades
eines Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)
genehmigte
D i s s e r t a t i o n

von Tim Harig
aus Peine

1. Referent: Prof. Dr. Stefan Schulz
2. Referent: Prof. Dr. Thomas Lindel
eingereicht am: 10.02.2021
mündliche Prüfung (Disputation) am: 14.04.2021

Druckjahr 2021

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikationen

T. Harig, C. Schlawis, L. Ziesche, M. Pohlner, B. Engelen, S. Schulz „*Nitrogen-Containing Volatiles from Marine Salinispora pacifica and Roseobacter-Group Bacteria*“, *J. Nat. Prod.* **80**, 12, 3289–3295 (2017).

K. Lukas, T. Harig, S. Schulz, J. Hadersdorfer, S. Dötterl „*Flowers of European pear release common and uncommon volatiles that can be detected by honey bee pollinators*“, *Chemoecology* **29**, 211-223 (2019).

S. Schulz, P. Biwer, T. Harig, D. Koteska, C. Schlawis „*Chemical Ecology of Bacterial Volatiles*“, *Comprehensive Natural Products III*, Elsevier, **2020**, S. 161–178.

S. Schulz, C. Schlawis, D. Koteska, T. Harig, P. Biwer „*Structural Diversity of Bacterial Volatiles*“, *Bacterial Volatile Compounds as Mediators of Airborne Interactions* **2020**, S. 93-122.

Posterbeiträge

VAAM Jahrestagung, Wolfsburg, Deutschland (2018)

“Identification of volatiles mediating interactions between marine bacteria”, Poster

Symposium Marine Microbiota “Ecology, Interactions and Systems Biology”, Oldenburg, Deutschland (2019)

“Volatile profiling of *Salinispora* Bacteria”, Poster

„Nichts ist offensichtlicher, als dass die Natur die Vernunft hasst.“

- Oscar Wilde

Für meine Familie

Danksagung

Bei Herrn Prof. Dr. Stefan Schulz möchte ich mich für die Möglichkeit zur Promotion, die freundliche Aufnahme in den Arbeitskreis und die stete Hilfsbereitschaft bei wissenschaftlichen Fragen herzlichst bedanken.

Herrn Prof. Dr. Thomas Lindel danke ich für die Übernahme des Korreferats.

Sehr herzlich möchte ich auch Herrn Prof. Dr. Karsten Hiller für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes danken.

Weiterhin möchte ich mich bei meinem Kooperationspartner Paul R. Jensen vom Scripps Institute of Oceanography in San Diego, Kalifornien für die Zusammenarbeit und die Bereitstellung der vielen Bakterienkulturen bedanken. Ebenso danke ich den Mitarbeitern der NMR- und Massenspektrometrischen Abteilung für das Vermessen der vielen Proben.

Bei meinen aktuellen und ehemaligen KollegInnen Dr. Jan Bello, Peter Biwer, Dr. Hilke Bruns, Dr. Jana Caspers, Stephanie Ehlers, Tim Gauger, Moritz Gerbaulet, Dr. Christopher Grimm, Dr. Ulrike Groenhagen, Jonas Holste, Dr. Janosch Knepper, Diana Koteska, Angelique Ladwig, Dr. Florian Mann, Dr. Kristina Melnik, Dr. Markus Menke, Anton Moellerke, Srinivasa Rao Ravella, Dr. René Röpke, Dr. Christian Schlawis, Dr. Witali Schmidt, Ozan Solak, Patrick Stamm, Dr. Michael Steinbiß, Dr. Matthew Stell, Dr. Daiane Szczerbowski, Dr. Nargis Khakin Taniwal, Dr. Lisa Ziesche, Prof. Dr. Diogo M. Vidal, Serdar Dilek und Jasmin Müller möchte ich mich für die freundliche Arbeitsatmosphäre, Hilfe bei Problemen und vielen Anregungen bedanken. Auch meinen PraktikantInnen gilt mein Dank für das erfolgreiche Ausprobieren einiger Synthesen und Ideen.

Ein besonderer Dank gilt meinen Kollegen aus dem Labor 320 für schöne Zeit und das Ertragen meiner Musik. Zu guter Letzt bedanke ich mich bei all meinen FreundInnen, meiner Familie und vor allem meiner Frau, die mich immer unterstützt und vorangebracht hat. Ohne euch hätte ich Vieles nicht erreicht.

Vielen Dank für all die Erfahrungen in den letzten Jahren.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Flüchtige Verbindungen aus Bakterien.....	1
1.2. Gasphasenanalyse.....	2
1.3. Strukturbestimmung unbekannter Verbindungen	4
1.4. <i>Salinispora</i>	5
2. Aufgabenstellung	9
3. Metabolitenprofilanalyse von <i>Salinispora</i>-Bakterien.....	11
3.1. Neue flüchtige Verbindungen aus Bakterien	11
3.1.1. Unbekannte S-haltige Verbindungen aus <i>Salinispora</i> - und <i>Roseobacter</i> - Bakterien	11
3.1.2. Neue N-haltige Metabolite aus <i>S. pacifica</i> CNS-863 und <i>S. tropica</i> CNB-440	13
3.1.3. Neuer Methylester aus <i>S. oceanensis</i> CNT-403	18
3.2. Duftprofilanalyse verschiedener <i>Salinispora</i> -Spezies.....	20
3.2.1. <i>Salinispora arenicola</i> (CNS-205)	20
3.2.2. <i>Salinispora tropica</i> (CNB-440).....	27
3.2.3. <i>Salinispora arenicola</i> (CNH-643).....	31
3.2.4. <i>Salinispora pacifica</i> (CNR-114)	36
3.2.5. <i>Salinispora pacifica</i> (CNR-894)	40
3.2.6. <i>Salinispora fenicalii</i> (CNR-942)	45
3.2.7. <i>Salinispora cortesiana</i> (CNY-202)	49
3.2.8. <i>Salinispora vitiensis</i> (CNS-055)	54
3.2.9. <i>Salinispora mooreana</i> (CNS-237)	58
3.2.10. <i>Salinispora oceanensis</i> (CNT-029).....	63
3.2.11. <i>Salinispora oceanensis</i> (CNT-403).....	67
3.2.12. <i>Salinispora oceanensis</i> (CNT-854).....	78
3.2.13. <i>Salinispora goodfellowii</i> (CNY-666).....	82

3.3. Statistische Analyse der Metabolitenprofile	86
3.3.1. Erstellen einer VOC-Datenbank für <i>Salinispora</i> Bakterien	86
3.3.2. Diskriminantenanalyse der Hauptkomponenten	87
3.4. Chemische Kommunikation durch VOCs	98
3.4.1. Einfluss volatiler Verbindungen auf das Wachstum.....	100
3.4.2. Veränderungen der Metabolitenprofile in Kommunikations-experimenten	101
4. Zusammenfassung und Ausblick	106
5. Experimenteller Teil.....	110
5.1. Allgemeines.....	110
5.1.1. Chemikalien.....	110
5.1.2. Dünnschicht- und Säulenchromatographie.....	110
5.1.3. NMR-Spektroskopie	110
5.1.4. Gaschromatographie/Massenspektrometrie.....	110
5.1.5. IR-Spektroskopie	111
5.2. Kultivierung von Bakterienkulturen	112
5.2.1. Ansetzen von Medien	112
5.2.2. Ansetzen von Bakterienkulturen.....	112
5.2.3. Extraktion von flüchtigen Bakterienverbindungen.....	112
5.3. Statistische Auswertung	112
5.4. Synthesen	113
5.4.1. <i>N</i> -Isobutylmethanesulfinamid (24).....	113
5.4.2. <i>N</i> -Isopentylmethanesulfinamid (25).....	114
5.4.3. (<i>E</i>)-2-(Hydroxyimino)butan-3-on (59)	114
5.4.4. (<i>E</i>)-2-(Hydroxyimino)pentan-3-on (58)	115
5.4.5. (<i>E</i>)-2-(Hydroxyimino)hexan-3-on (60).....	116
5.4.6. Synthese von (<i>E</i>)-2-(Hydroxyimino)-4-methylpentan-3-on (62)	116
5.4.6.1. 2-Hydroxy- <i>N</i> -methoxy- <i>N</i> ,3-dimethylbutanamid (68)	116
5.4.6.2. (<i>E</i>)-2-(Hydroxyimino)-4-methylpentan-3-on (62).....	117

5.4.7. Synthese von (<i>E</i>)-2-(Hydroxyimino)-5-methylpentan-3-on (63)	118
5.4.7.1. 2-Hydroxy- <i>N</i> -methoxy- <i>N</i> ,4-dimethylpentanamid (69)	118
5.4.7.2. (<i>E</i>)-2-(Hydroxyimino)-5-methylpentan-3-on (63).....	119
5.4.8. 2-(Bis(2,2,2-trifluoroethoxy)phosphoryl)essigsäuremethylester (44b)	121
5.4.9. (<i>Z</i>)-2,5-Dimethyl-2,4-hexensäuremethylester (43).....	121
5.4.10. (<i>E</i>)-2,5-Dimethyl-2,4-hexensäuremethylester (41)	123
5.4.11. Vorschrift für allgemeine Iminsynthese.....	123
5.4.11.1. (<i>E</i>)- <i>N</i> -Isobutyl-1-(pyridin-3-yl)methanimin (28)	124
5.4.11.2. (<i>E</i>)- <i>N</i> -(2-Methylbutyl)-1-(pyridin-3-yl)methanimin (29).....	124
5.4.11.3. (<i>E</i>)- <i>N</i> -Isopentyl-1-(pyridin-3-yl)methanimin (30)	125
5.4.12. 2-Formamidobenzoessäuremethylester (39).....	125
5.4.13. Synthese von (<i>E</i>)-4,6-Dimethyloct-6-en-3-on (204).....	126
5.4.13.1. (<i>E</i>)-2-Methylbut-2-en-1-ol (52)	126
5.4.13.2. (<i>E</i>)-1-Bromo-2-methyl-2-buten (205)	127
5.4.13.3. (<i>E</i>)-4,6-Dimethyloct-6-en-3-on (204).....	127
5.4.14. 2,4-Hexandion (217).....	128
5.4.15. 1-(1-Acetylcyclopropyl)-propan-1-on (214)	129
5.4.16. 3-Ethylidenhexan-2,4-dion (213)	130
5.4.17. 2-(2-Methyl-1,3-dioxolan-2-yl)essigsäuremethylester (208)	130
5.4.18. 6.3.18 2-(2-Methyl-1,3-dioxolan-2-yl)ethan-1-ol (209)	131
5.4.19. 2-(2-Methyl-1,3-dioxolan-2-yl)acetaldehyd (210).....	131
5.4.20. (<i>E</i>)-6-(2-Methyl-1,3-dioxolan-2-yl)hex-4-en-3-on (212).....	132
5.4.21. Hept-3-in-2,5-diol (218)	132
5.4.22. Hept-3-en-2,5-diol (220)	133
5.4.23. Hept-3-en-2,5-dion (221)	134
5.4.24. 1-(2-Acetylcyclopropyl)propan-1-on (215)	134
6. Verzeichnisse.....	135
6.1. Literaturverzeichnis	135

6.2. Abkürzungsverzeichnis.....	144
6.3. Abbildungen	146
6.4. Schemata	150
6.5. Tabellen.....	151
7. Anhang	154

1. Einleitung

1.1. Flüchtige Verbindungen aus Bakterien

Bakterien kommen in allen Habitaten auf der Erde vor und können oft auch unter extremsten Bedingungen überleben.^[1] Die von ihnen produzierten Naturstoffe sind essenziell für Medizin, Landwirtschaft und Lebensmitteltechnik und werden vielfältig eingesetzt, z.B. als Antibiotika, Wachstumsförderer für Pflanzen oder als Aromastoffe in Lebensmitteln.^[2] Dabei wird zwischen Primär- und Sekundärmetaboliten unterschieden.^[3] Letztere sind uns Menschen meist als Aromastoffe aus z.B. Käse oder Wein bekannt, aber auch der erdige Geruch des Bodens ist bakteriellen Ursprungs und stammt von dem Terpenoid Geosmin (**1**).^[4,5]

Bakterien formen diverse, dynamische Populationen, deren Überleben stark von der Fähigkeit abhängt sich schnell an ändernde Lebensumstände anzupassen.^[6] Ein Ansatz dazu ist die Produktion volatiler organischer Verbindungen (VOCs), die sich schnell durch Wasser und Erde verteilen können und damit für Interaktionen mit anderen Spezies über verhältnismäßig weite Distanzen geeignet sind.^[7] Der Grund für die Produktion von flüchtigen Verbindungen durch Bakterien ist, trotz steigender Zahl von Publikationen zu diesem Thema, immer noch größtenteils unklar. Es deutet viel darauf hin, dass diese sowohl zur Abwehr gegen Feinde, als auch zur intra- und interspezifischen Kommunikation genutzt werden.^[7–9]

Quorum Sensing ist ein prominentes Beispiel für interzelluläre Kommunikation von Bakterien, wodurch viele Vorgänge innerhalb einer Population gesteuert werden. Abhängig von der Zelldichte wird die Genregulation durch sogenannte Autoinducer – wie z.B. *N*-Acylhomoserinlactone (AHLs) in Gram-negativen Bakterien – beeinflusst, wodurch Prozesse wie Antibiotikaproduktion, Biofilmbildung oder auch Virulenz gesteuert werden.^[10] Einige VOCs können durch Reduzierung der AHL-Sensoraktivität in diese Prozesse eingreifen und könnten dadurch ein Überleben in Konkurrenz mit anderen Bakterien ermöglichen.^[9] Weiterhin können diverse Sekundärmetabolite einen Einfluss auf Resistenzen haben. So wirkt Trimethylamin (**2**), das von diversen Bakterien produziert wird, pH-senkend auf die Umgebung und verändert so die Antibiotika-Aufnahme diverser Gram-positiver und Gram-negativer Bakterien.^[11]

VOCs haben jedoch nicht nur einen Einfluss auf andere Bakterien, sondern können gänzlich unterschiedliche Wirkung auf andere Organismen wie Pflanzen, Pilze oder Insekten haben. So unterdrücken die bakteriellen Verbindungen Dimethyldisulfid (**3**), sowie die beiden Ketone 2-Nonanon (**4**) und 2-Undecanon (**5**) das Mizellen-Wachstum

von *Rhizoctonia solani*.^[12] Weiterhin wirken **4** und **5**, als auch 2,3-Butandiol (**6**) und Acetoin (**7**) wachstumsfördernd auf den Gartensalat *Lactuca sativa*.^[13] Für die gemeine Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* hingegen sind die VOCs **3**, **4** und **5** tödlich.^[12] Aufgrund dieser vielfältigen Wirkungsweisen der Sekundärmetabolite, der komplexen Zusammensetzung des Metabolitenprofils, sowie des Einflusses der Kultivierungsbedingungen^[14,15] auf die Produktion der VOCs, gestalten sich wissenschaftliche Untersuchungen zu diesem Thema schwierig und zeitaufwändig. Durch weitere Analysen und neuartige Methoden lassen sich neue interessante Naturstoffe identifizieren und Zusammenhänge zwischen den Metaboliten und ihrer Wirkungsweise aufklären.

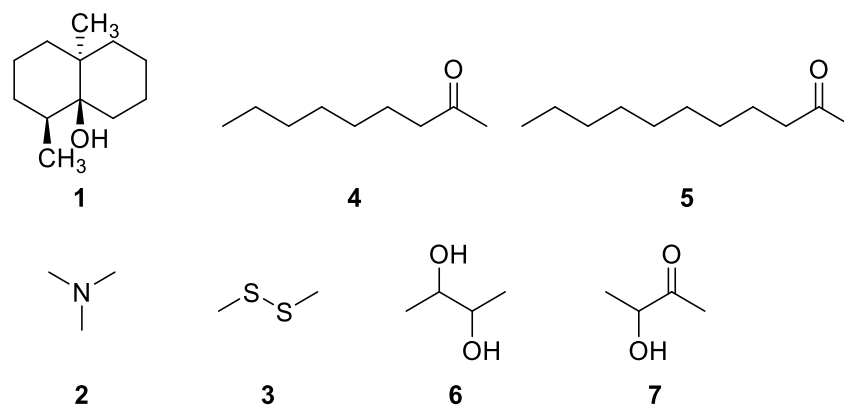


Abbildung 1: Übersicht über verschiedene bakterielle VOCs: Dimethyldisulfid (**3**), Trimethylamin (**2**), 2,3-Butandiol (**6**), Acetoin (**7**), 2-Nonanon (**4**), 2-Undecanon (**5**) und Geosmin (**1**).

1.2. Gasphasenanalyse

Die gängigsten Verfahren zur Untersuchung flüchtiger Verbindungen sind, aufgrund ihrer herausragenden Sensitivität und Trennstärke, die Gerätekopplungen aus Gaschromatographie mit Massenspektrometrie (GC/MS).^[16] Zur Gewinnung der flüchtigen Komponenten sind diverse Methoden bekannt. Eine häufig eingesetzte Technik ist die flüssig/flüssig Extraktion, bei der allerdings flüchtige Analyten während der Konzentrationsschritte durch Verdampfen verloren gehen können.^[17] Diese Methode ist daher hauptsächlich für nicht flüchtige Verbindungen geeignet. Die Gasphasenextraktion zur Analyse von VOCs bietet durch den Einsatz verschiedener Adsorptionsmittel vielfältige Einsatzmöglichkeiten. Hierbei wird zunächst zwischen statischer- (static Headspace, SHS) und dynamischer (dynamic Headspace, DHS) Gasphasenanalyse unterschieden.^[18]

Bei SHS-Methoden wird das Sorbens in Kontakt mit der immobilen Gasphase gebracht und dort für eine feste Verweilzeit belassen. Ein Beispiel ist die häufig genutzte Festphasen-Mikroextraktion (Solid-Phase-Microextraction, SPME), bei der die VOCs an einem Adsorbens gebunden und anschließend thermisch wieder desorbiert werden.^[19] Obwohl diese Methode einfach in der Durchführung ist, ist sie aufgrund der geringen Menge an Adsorbens weniger sensitiv für nur in geringen Konzentrationen vorkommenden VOCs und daher nicht optimal geeignet.^[18,20]

Bei DHS-Verfahren werden die Analyten über eine mobile Gasphase z.B. über entsprechend große Mengen eines Adsorbens geleitet, sodass eine größere Menge an VOCs adsorbiert werden kann.^[15] Sie sind aufgrund ihrer Flexibilität in Bezug auf das zu untersuchende Probenvolumen und Auffangmöglichkeiten die am häufigsten eingesetzte Gasphasenanalytik, obwohl komplexere Instrumente und Beprobungsparameter die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse erschweren.^[18]

In dieser Arbeit wurde die dynamische Headspaceanalyse in zwei unterschiedlichen Verfahren angewendet. Zum einen wurde die Gasphase in einem offenen System^[15,21] (Open-System-Stripping-Analysis, OSSA) und zum anderen in einem geschlossenen System^[22] (Closed-Loop-Stripping-Analysis, CLSA) gesammelt. Bei Ersterem wurde die Gasphase über der Probe durch einen mit Tenax gefüllten Filter abgepumpt (Abb.1, links), welcher im Anschluss vollständig über eine thermische Desorptionseinheit (Thermal-Desorption-Unit, TDU) mittels GC/MS analysiert wurde. Bei letzterer Methode wurde ein kontinuierlicher Gasstrom über die Probe geleitet und dabei die flüchtigen Bestandteile auf einem Aktivkohlefilter angereichert (Abb. 1, rechts). Dieser wurde im Anschluss mit Dichlormethan extrahiert und das Extrakt mit diversen Methoden analysiert. Beide Methoden haben sowohl Vor- als auch Nachteile. Für die erste Methode reichen relativ kurze Extraktionszeiten von 2-6 h aus. Zusammen mit der hohen Sensitivität durch die Aufgabe größerer Probenmengen und der Tatsache, dass durch die TDU keine Lösungsmittel zur Extraktion genutzt werden müssen, lassen sich schnell viele Proben auch auf extrem flüchtige Komponenten hin untersuchen. Allerdings steht die Probe nach der Desorption nicht mehr für weitere Analysen zur Verfügung. Die zweite Methode benötigt einen größeren Arbeitsaufwand und die Extraktionszeiten betragen zwischen 24-48 h. Im Anschluss müssen die Aktivkohlefilter noch manuell extrahiert werden. Die erhaltenen Extrakte bieten allerdings die Möglichkeit, zusätzliche Informationen über die Probe jenseits von GC/MS mit Hilfe anderer analytischer Methoden wie Gaschromatographie gekoppelt

an Infrarotspektroskopie (GC/DD-FTIR)^[23] oder hochaufgelöster Massenspektrometrie (HRMS) zu erhalten. Die Extrakte können zudem derivatisiert werden, um z.B. polare Substanzen mittels GC/MS zu untersuchen^[24] oder auch Doppelbindungspositionen in ungesättigten Verbindungen^[25] zu bestimmen. Diese so gewonnenen orthogonalen Informationen sind ein erheblicher Vorteil für die Strukturaufklärungen unbekannter Naturstoffe. Aufgrund des verwendeten Lösungsmittels lassen sich allerdings extrem flüchtige Verbindungen nicht nachweisen und gehen im *Solvent-Delay* des Gaschromatographen verloren.

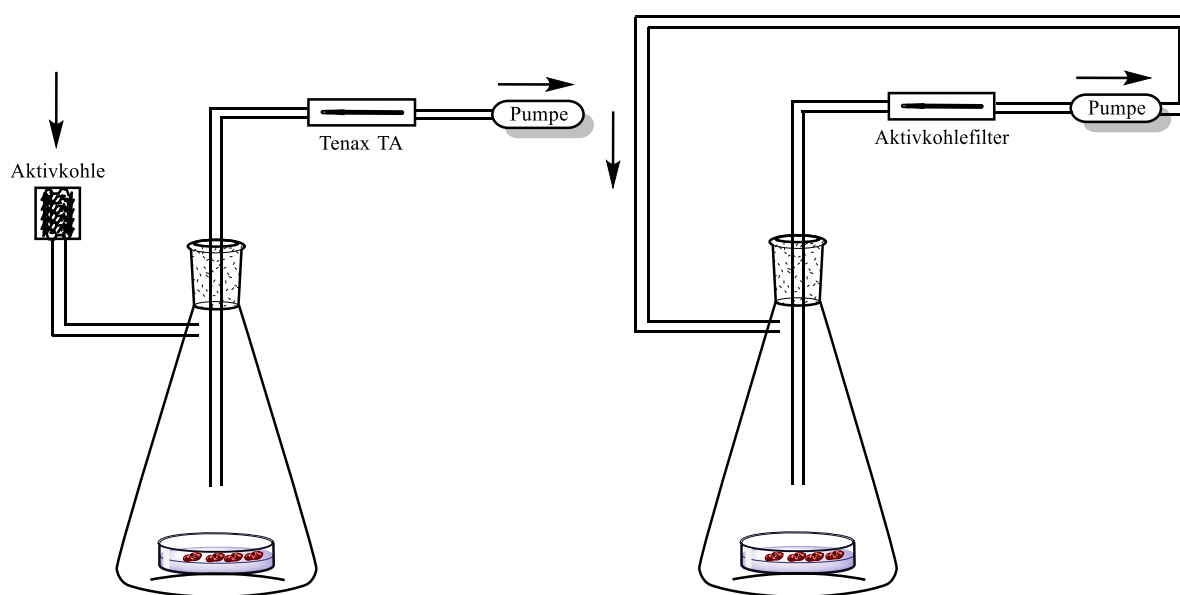


Abbildung 2: links: Schematischer Aufbau einer OSSA-Apparatur, rechts: Schematischer Aufbau einer CLSA-Apparatur.

1.3. Strukturbestimmung unbekannter Verbindungen

Die Bestimmung der Zusammensetzung eines Extrakts wird heutzutage oftmals automatisiert durchgeführt. Die aufgenommenen EI-Massenspektren können mit bestehenden Datenbanken wie der *NIST-Library*^[26] abgeglichen werden, um eine schnelle Identifizierung zu ermöglichen.^[27] Bei literaturunbekannten Verbindungen können jedoch durch zufällige Übereinstimmungen Strukturvorschläge übernommen werden, die nicht zutreffend sind.^[17] Neben Spektralvergleichen sollte daher auch immer der Retentionsindex^[28] der Verbindungen verglichen werden. Nur wenn dieser zusammen mit dem Massenspektrum zu dem einer Referenzsubstanz passt, kann von einer richtigen Zuordnung ausgegangen werden. Zusätzlich ist ein Verständnis der Zerfallsmechanismen und biosynthetischer Prozesse zur Interpretation der

Massenspektren unerlässlich, damit nicht fälschlicherweise Verunreinigungen als Naturstoffe klassifiziert werden.^[17]

Bei unbekannten Verbindungen muss der auf den Zerfallsprodukten basierende Strukturvorschlag dann durch eine Referenzprobe bestätigt werden. Die Referenz kann z.T. käuflich erworben werden, muss allerdings in vielen Fällen synthetisch hergestellt werden. Oftmals lassen sich jedoch allein aufgrund der GC/MS Informationen keine qualifizierten Strukturvorschläge erstellen. Hierbei kann die Aufnahme weiterer orthogonaler analytischer Daten, wie IR-Spektren und hochaufgelösten Massenspektren, von großer Hilfe sein.^[29] Durch stetige Weiterentwicklung analytischer Verfahren und den daraus resultierenden sinkenden Nachweisgrenzen können bisher unbekannte Verbindungen zukünftig aufgeklärt werden.

1.4. *Salinispora*

Salinispora-Bakterien gehören zur Klasse der Actinomyceten und finden sich vor allem in Sedimenten der tropischen und subtropischen Bereiche der Ozeane,^[30] können aber auch auf marinen Schwämmen^[31], Seegräsern^[32] und Seescheiden^[33] vorkommen. Sie wurden erstmals 2005 von FENICAL und JENSEN beschrieben und umfassen die drei Spezies *S. arenicola*, *S. tropica* und *S. pacifica*.^[30,34,35] Neuere genetische Untersuchungen führten zu insgesamt noch mindestens sechs weiteren Spezies.^[36,37]

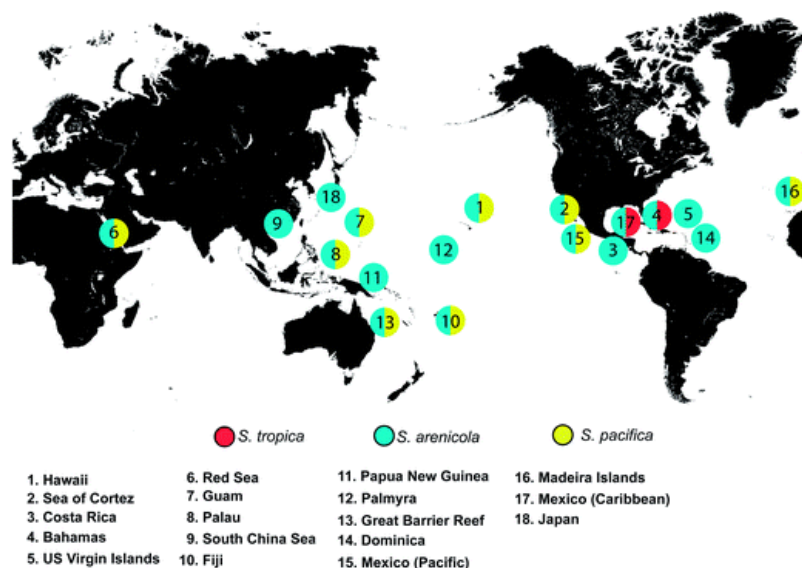


Abbildung 3: Fundorte der drei *Salinispora*-Spezies *S. tropica*, *S. arenicola* und *S. pacifica*.^[30]

Salinispora sind für ihre vielfältige Produktion an diversen Sekundärmetaboliten bekannt.^[30] Einige dieser Metabolite zeigen eine vielversprechende Bioaktivität. Dazu

zählen unter anderem das Proteasom-inhibierende Salinosporamid A (**8**)^[38] und das gegen Malaria aktive Salinipostin A (**9**)^[39] (Abbildung 4). Als VOCs sind vor allem verschiedene gesättigte und ungesättigte Alkohole, Ketone und Ester bekannt.^[40]

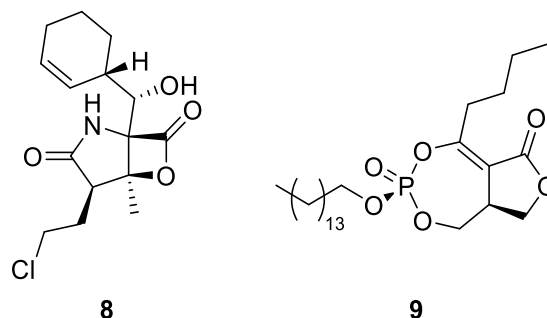


Abbildung 4: Strukturen von Salinosporamid A (**8**) und Salinipostin A (**9**) aus *Salinispora*.

Von GROENHAGEN konnten einige Cyclohexenylderivate wie 2-Cyclohexen-1-carbonsäuremethylester (**10**), Methyl 2-(cyclohex-2-enyl)acetat (**11**), oder die beiden Alkohole 2-Cyclohexene-1-methanol (**12**) und 2-Cyclohexene-1-ethanol (**13**) in *S. tropica* CNB-440 identifiziert werden (Abbildung 7).^[40,41] Biosynthetische Untersuchungen zeigten, dass diese mit der Biosynthese des Cyclohexenylalanin-Bausteins aus **8** in Verbindung stehen.^[40,41] Besonders hervorzuheben sind die zwei ungewöhnlichen Methylester (*Z*)- und (*E*)-Methyl 2-(cyclohex-2-enyliden)acetat (**14**, **15**), welche wohl durch enzymatische oxidative Decarboxylierung und anschließender SAM-Methylierung aus den Diensäuren (*Z/E*)-3-(Cyclohex-2-en-1-yliden)-2-oxopropansäure gebildet werden.^[40] Die Massenspektren dieser Verbindungen zeigen neben den gewöhnlichen Methylester-Fragmenten $[M-15]^+$, $[M-31]^+$ und $[M-59]^+$ auch die Ionen $m/z = 39$, 65, 77 und 91, welche eigentlich aus Benzyl-Ionen bekannt sind und wohlmöglich durch Umlagerung und den Verlust von H_2 aus dem Cyclohexen-Ring gebildet werden.

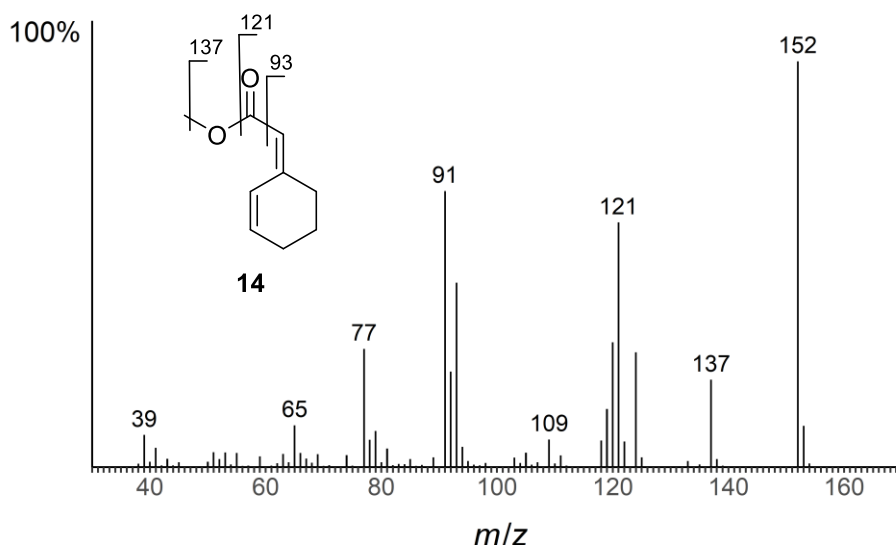


Abbildung 5: Massenspektrum des von GROENHAGEN identifizierten (Z)-Methyl 2-(cyclohex-2-enyliden)acetats (**14**).^[41]

Weiterhin wurden von SCHLAWIS eine Gruppe bicyklischer Lactone mit Hilfe von IR-Spektroskopie und DFT-Berechnungen aufgeklärt.^[42,43] Diese sogenannten Salinilactone sind strukturell mit dem A-Faktor γ -Butyrolacton (GBL) verwandt. Die Biosynthese dieser Verbindungen ist mit dem *spt* Gencluster verbunden, welcher auch für die Salinipostine verantwortlich ist.^[43] Die charakteristischen Fragmente $m/z = 122$, 140 in den Massenspektren dieser Verbindungen (Abbildung 6) entstehen durch eine McLafferty-Umlagerung mit anschließendem Verlust von Wasser.^[42,43] Die Salinilactone zeigen eine signifikante Zytotoxizität gegen Salinenkrebse und auch eine inhibierende Wirkung gegen die Actinomyceten *Micromonospora echinospora* DSM 43816 und *Actinoplanes teichomyceticus* DSM 43866 in Diffusionstest.^[43] Bisher wurde die Stereochemie nur für Salinilacton A-C aufgeklärt.^[42] Es ist allerdings davon auszugehen, dass auch Salinilacton D-H die gleiche Konfiguration besitzen.

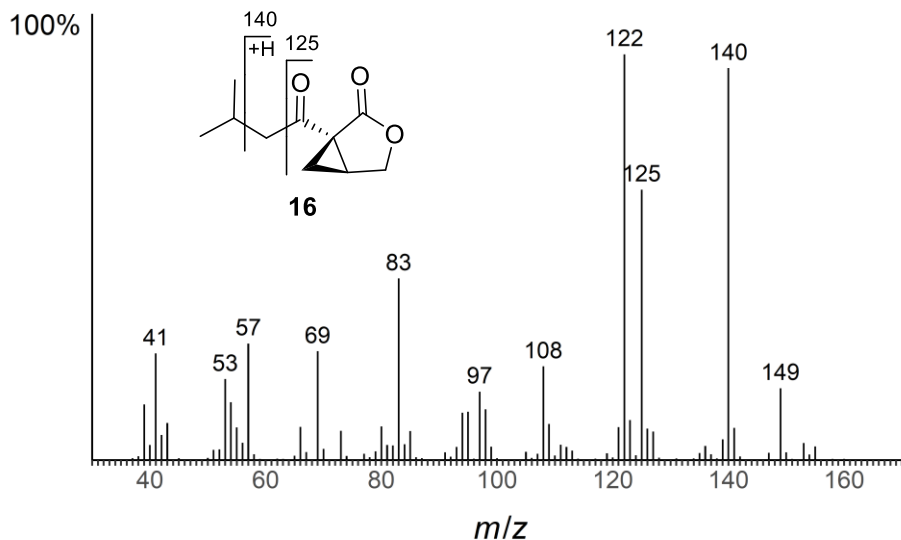


Abbildung 6: Massenspektrum von Salinilacton A (**16**) mit Fragmentierung.

Viele weitere Verbindungen konnten jedoch bisher nicht identifiziert werden. Gründe hierfür sind die komplexen Headspace-Extrakte mit z.T. über 100 verschiedenen Metaboliten und die oftmals sehr geringen Konzentrationen der vorkommenden Substanzen.

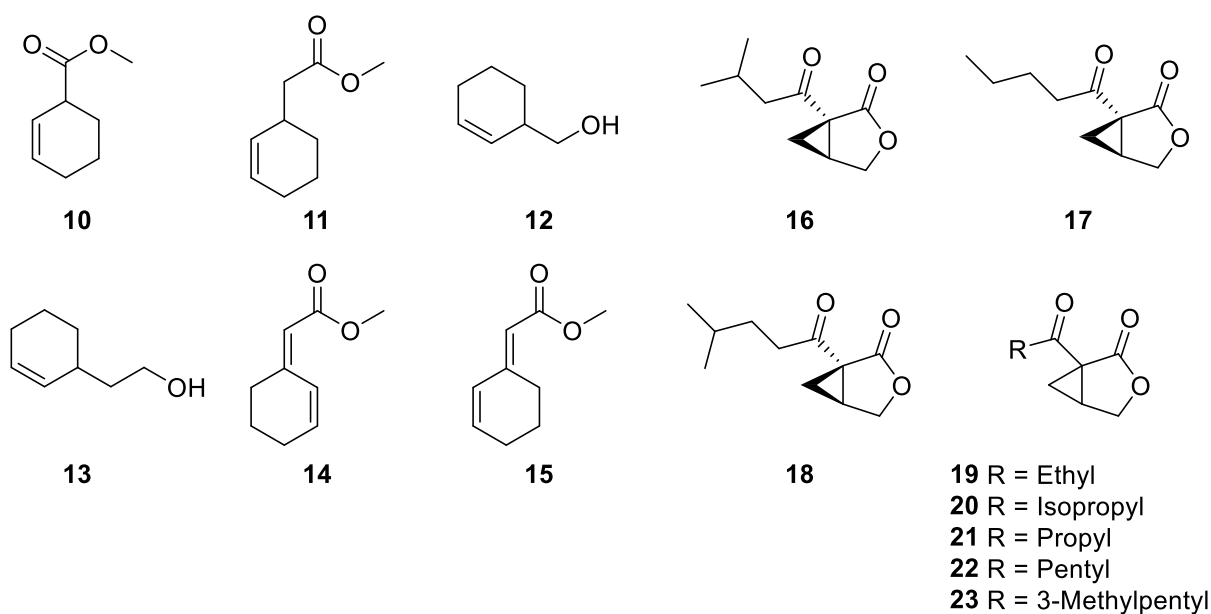


Abbildung 7: Strukturen der bereits von GROENHAGEN und SCHLAWIS identifizierten flüchtigen Cyclohexenyl-Verbindungen (**10-15**) und Salinilactone A-H (**16-23**) aus *Salinispora*-Bakterien.^[40,43]

2. Aufgabenstellung

In dieser Arbeit sollten die Geruchsprofile diverser *Salinispora*- und verwandter Bakterien mit Hilfe von CLSA und OSSA untersucht werden. Die Fragestellungen können in zwei Themenengebiete unterteilt werden.

In Kooperation mit P. R. Jensen von der Scripps Institution of Oceanography in San Diego, Kalifornien sollte anhand von dreizehn verschiedenen *Salinispora*-Bakterien überprüft werden, ob sich die genetische Verwandtschaft auch in der Produktion flüchtiger Sekundärmetabolite widerspiegelt. Dabei sollte untersucht werden, inwieweit sich die Metabolitenprofile der neu publizierten Spezies^[37] voneinander abgrenzen. Hierzu sollten die Duftprofile mittels GC/MS analysiert und miteinander verglichen werden. Anschließend sollte ein statistisches Modell entwickelt werden, mit Hilfe dessen eine Zuordnung der einzelnen Spezies anhand der produzierten VOCs möglich ist. Die Auswahl der Stämme (Tabelle 1) erfolgte nach der Zugehörigkeit zu den neuen *Salinispora*-Spezies und ihren Typenstämmen.^[36,37] Außerdem sollten bei den Analysen eventuell auftretende unbekannte Verbindungen identifiziert und zur Strukturverifizierung synthetisiert werden.

Im zweiten Teil sollte der Einfluss flüchtiger Verbindungen auf das Wachstum von *Salinispora*-Bakterien untersucht werden. Dazu sollten zunächst einzelne Stämme der Gattungen *Alteromonas*, *Pseudoalteromonas*, *Bacillus*, *Labrenzia*, *Vibrio*, *Shimia*, *Erythrobacter* und *Ruegeria* zusammen mit *Salinispora* kultiviert werden. Bei den Versuchen, bei denen es zu einer sichtbaren Änderung im Wachstum kam, sollten die Metabolitenprofile mittels CLSA genauer untersucht werden. Durch diese Reihe von Kommunikationsexperimenten sollten mögliche bioaktive Verbindungen identifiziert werden, die einen Einfluss auf den Metabolismus der Bakterien haben oder mit deren Hilfe Bakterien untereinander kommunizieren.

Weiterhin sollten mittels GC/MS und GC/DD-FTIR auftretende interessante, unbekannte Verbindungen aus den verschiedenen Analysen strukturell aufgeklärt werden. Strukturvorschläge sollten dann durch den Abgleich mit Referenzspektren aus synthetisch hergestellten Verbindungen verifiziert werden.

Tabelle 1: Auswahl der analysierten *Salinispora*-Bakterien und ihre Zuordnung zu den einzelnen Spezies. Typenstämme sind durch ein (T) gekennzeichnet.^[37]

Bakterienstamm	Spezies	Kulturmedium	Analysemethode
CNB ^T -440	<i>S. tropica</i>	A1	CLSA, OSSA
CNR-942	<i>S. fenicalii</i>	A1	CLSA, OSSA
CNY ^T -202	<i>S. cortesiana</i>	A1	CLSA, OSSA
CNS-237	<i>S. mooreana</i>	A1	CLSA, OSSA
CNT-403	<i>S. oceanensis</i>	A1	CLSA, OSSA
CNT-029	<i>S. oceanensis</i>	A1	CLSA, OSSA
CNT-854	<i>S. oceanensis</i>	A1	CLSA, OSSA
CNY ^T -666	<i>S. goodfellowii</i>	A1	CLSA, OSSA
CNS-055	<i>S. vitiensis</i>	A1	CLSA, OSSA
CNR-894	<i>S. pacifica</i>	A1	CLSA, OSSA
CNR ^T -114	<i>S. pacifica</i>	A1	CLSA, OSSA
CNS-205	<i>S. arenicola</i>	A1	CLSA, OSSA
CNH ^T -643	<i>S. arenicola</i>	A1	CLSA, OSSA

3. Metabolitenprofilanalyse von *Salinispora*-Bakterien

3.1. Neue flüchtige Verbindungen aus Bakterien

Im Verlauf dieser Arbeit wurden verschiedene *Salinispora* und andere Bakterien auf neue flüchtige Verbindungen hin untersucht. Dazu wurden sowohl Flüssig- als auch Plattenkulturen verwendet. Die Flüssigkulturen wurden für mindestens sieben Tage auf dem Schüttler bei 28 °C kultiviert. Bei den Plattenkulturen war ein ausreichendes Wachstum nach drei bis fünf Tagen erreicht. Im Anschluss wurden die flüchtigen Bestandteile mittels CLSA für 24 h auf einem Aktivkohlefilter angereichert und danach dreimal mit 20 µL Dichlormethan extrahiert. Die erhaltenen Extrakte wurden dann mittels GC/MS analysiert. Dabei traten einige neue flüchtige Verbindungen auf, deren Identifizierung in den folgenden Kapiteln beschrieben wird.

3.1.1. Unbekannte S-haltige Verbindungen aus *Salinispora*- und *Roseobacter*-Bakterien

In dem Stamm *S. pacifica* CNS-863 sowie in diversen anderen *Roseobacter*-Bakterien wurde die unbekannte Verbindung **A** mit dem Molpeak $m/z = 135$ in CLSA-Extrakten von Flüssigkulturen gefunden.^[44] Die Summenformel konnte durch HRMS zu $C_5H_{13}NOS$ (gemessen 135.07374, berechnet 135.07178) bestimmt werden. Durch die Aufnahme eines IR-Spektrums (Abbildung 8) konnte eine intensive Bande bei 1051 cm^{-1} beobachtet werden, welche charakteristisch für Sulfinamide im Festkörper ist.^[45,46] Zusätzlich wurde die Bande bei 3184 cm^{-1} der N-H-Schwingung eines sekundären oder primären Amins zugeordnet.^[45,46] Die Ionen $m/z = 43$ und 57 im Massenspektrum weisen auf eine Isobutylgruppe hin, sodass noch eine Methylgruppe als zweites Kohlenwasserstoff-Fragment übrig bleibt. Die Zusammensetzung des Fragments $m/z = 64$ (CH_4SO) ließ daher nur die Platzierung neben dem Schwefel zu. Verbindung **A** wurde damit als *N*-Isobutylmethansulfinamid (**24**) identifiziert. Ähnliche Ionen $m/z = 43, 64, 71, 92, 134$ führten zur Identifizierung von *N*-Isopentylmethansulfinamid (**25**), welches zusammen mit einer anderen unbekannten Verbindung koeluierte (Abbildung 9). Die Strukturen beider Verbindungen wurden mittels Synthese nachgewiesen (Schema 1).^[44]

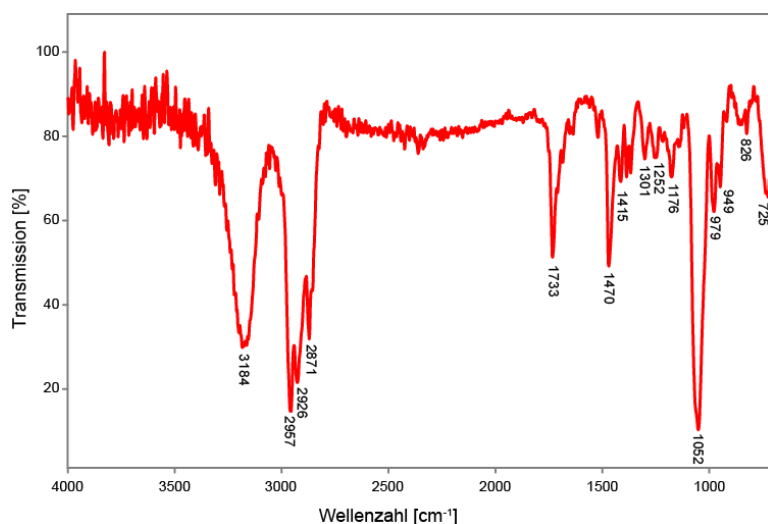
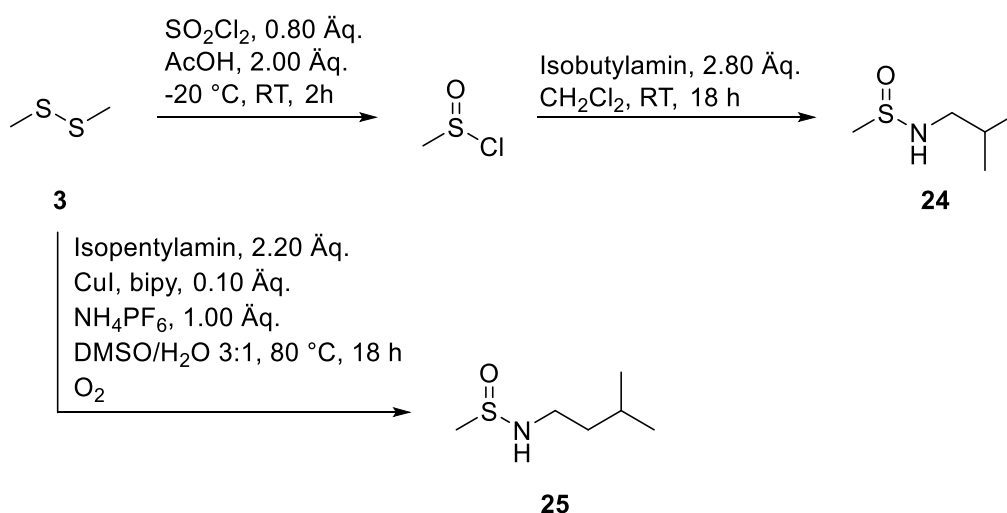


Abbildung 8: IR-Spektrum der unbekannten Verbindung **A**.



Schema 1: Synthese der Sulfinamide **24** und **25**.

Ausgehend von Dimethyldisulfid (DMDS, **3**) wurde zunächst das Sulfinsäurechlorid^[47] gebildet, welches sofort mit Isobutylamin zu **24** umgesetzt wurde. Da sich die Aufarbeitung des Produkts als schwierig erwies, wurde **25** direkt aus **3** und Isopentylamin mittels Kupferkatalyse hergestellt.^[48] Sulfinamide waren bisher nicht als Naturstoffe bekannt. Die Verbindungen **24** und **25** konnten allerdings nicht in anderen in dieser Arbeit untersuchten *Salinispora*-Bakterien nachgewiesen werden.

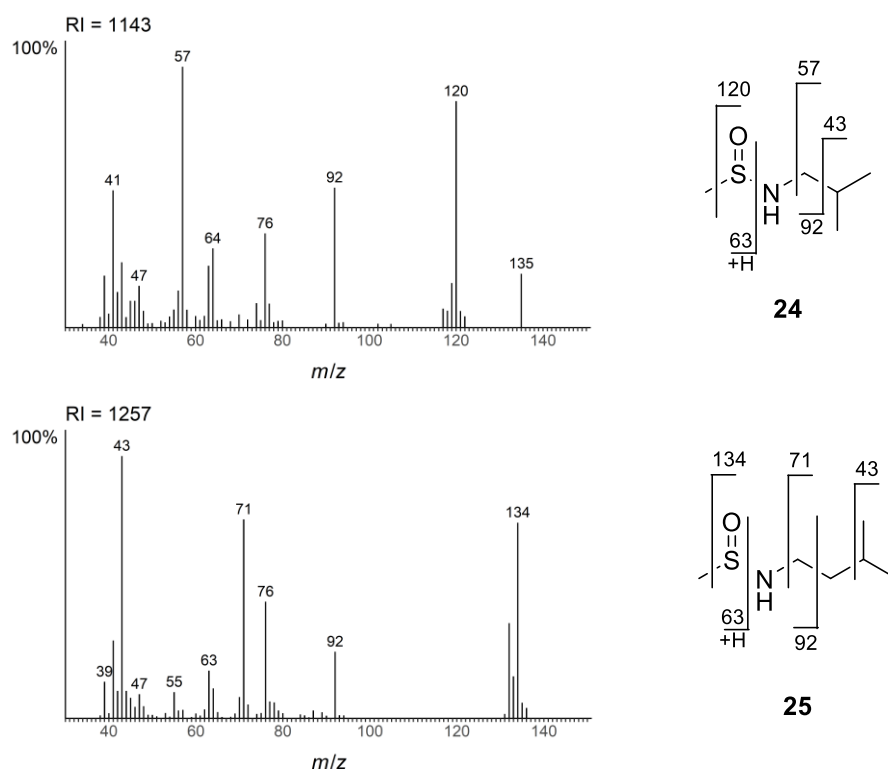
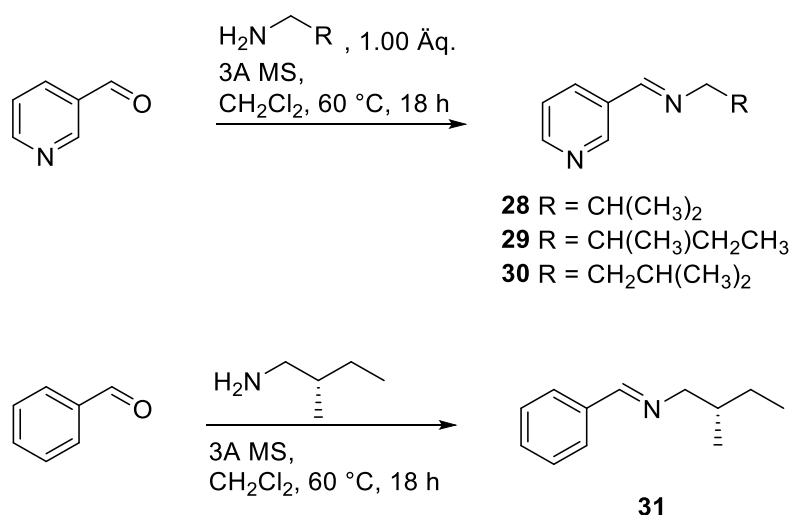


Abbildung 9: Massenspektren der Sulfonamide **24** (oben) und **25** (unten) mit Fragmentierung.

3.1.2. Neue *N*-haltige Metabolite aus *S. pacifica* CNS-863 und *S. tropica* CNB-440

Wie bereits in vorangegangenen Untersuchungen gezeigt werden konnte, weist das Duftprofil des *Salinispora*-Stammes CNS-863 eine große Anzahl aromatischer Imine auf (Abbildung 12).^[44] In einem weiteren CLSA-Extrakt einer Plattenkultur dieses Bakteriums wurde eine Verbindung gefunden, deren Massenspektrum große Ähnlichkeit mit dem des bekannten (*E*)-*N*-isobutyl-1-phenylmethanimins (**26**) aufweist. Die einzelnen Fragment-Ionen weisen jedoch eine jeweils um eins erhöhte Massenzahl auf. Durch die Messung eines hochaufgelösten Massenspektrums wurde die Summenformel zu $C_{10}H_{14}N_2$ bestimmt (HRMS gemessen 161.11008 $[M-H]^+$, berechnet 161.10787). Durch die Ionen $m/z = 92$ und 119, die wie bei **26** durch α -Spaltung am Imin-Stickstoff und formale Spaltung der $C=N$ Bindung inklusive eines H-Transfers entstehen, muss sich das zusätzliche Stickstoffatom im aromatischen Ring befinden. Da Nicotinsäure-Derivate wie Nicotinsäuremethylester (**27**) in dieser Arbeit auch in CNS-205 gefunden wurden, wurde (*E*)-*N*-Isobutyl-1-(pyridin-3-yl)methanimin (**28**) als die gesuchte Verbindung vorgeschlagen. Basierend auf den charakteristischen Fragment-Ionen $m/z = 92$ und 119 konnten auch die längeren

homologen (*E*)-*N*-(2-Methylbutyl)-1-(pyridin-3-yl)methanimin (**29**) und (*E*)-*N*-Isopentyl-1-(pyridin-3-yl)methanimin (**30**) in Spuren identifiziert werden. Beide koeluieren mit anderen unbekannten Verbindungen, sodass keine sauberen Massenspektren erhalten wurden. Die Synthese der Verbindungen wurden nach einer bereits etablierten Methode durchgeführt.^[44] Ausgehend von Nicotinaldehyd wurden die Imine durch Kondensation mit Isobutylamin und 2- bzw. 3-Methylbutylamin hergestellt (Schema 2). Die Massenspektren und Retentionsindices der synthetischen Verbindungen von **28** und **29** stimmen mit denen der natürlich vorkommenden überein (Abbildung 10). Die Identifizierung von **30** basiert aufgrund des unsauberen Massenspektrums der natürlichen Verbindung allein auf den charakteristischen Fragment-Ionen $m/z = 92, 98, 119$, sowie dem Vergleich der Retentionsindices. **29** und **30** konnten zudem als VOCs aus den Blüten der europäischen Kultur-Birne *Pyrus communis* L. nachgewiesen werden und besitzen einen elektrophysiologisch-aktiven Effekt auf Bienenantennen.^[49]



Schema 2: Synthese der unbekannten Imine **28-30** und des (*S*)-Konformers von (*E*)-*N*-(2-Methylbutyl)-1-phenylmethanimin (**31**).

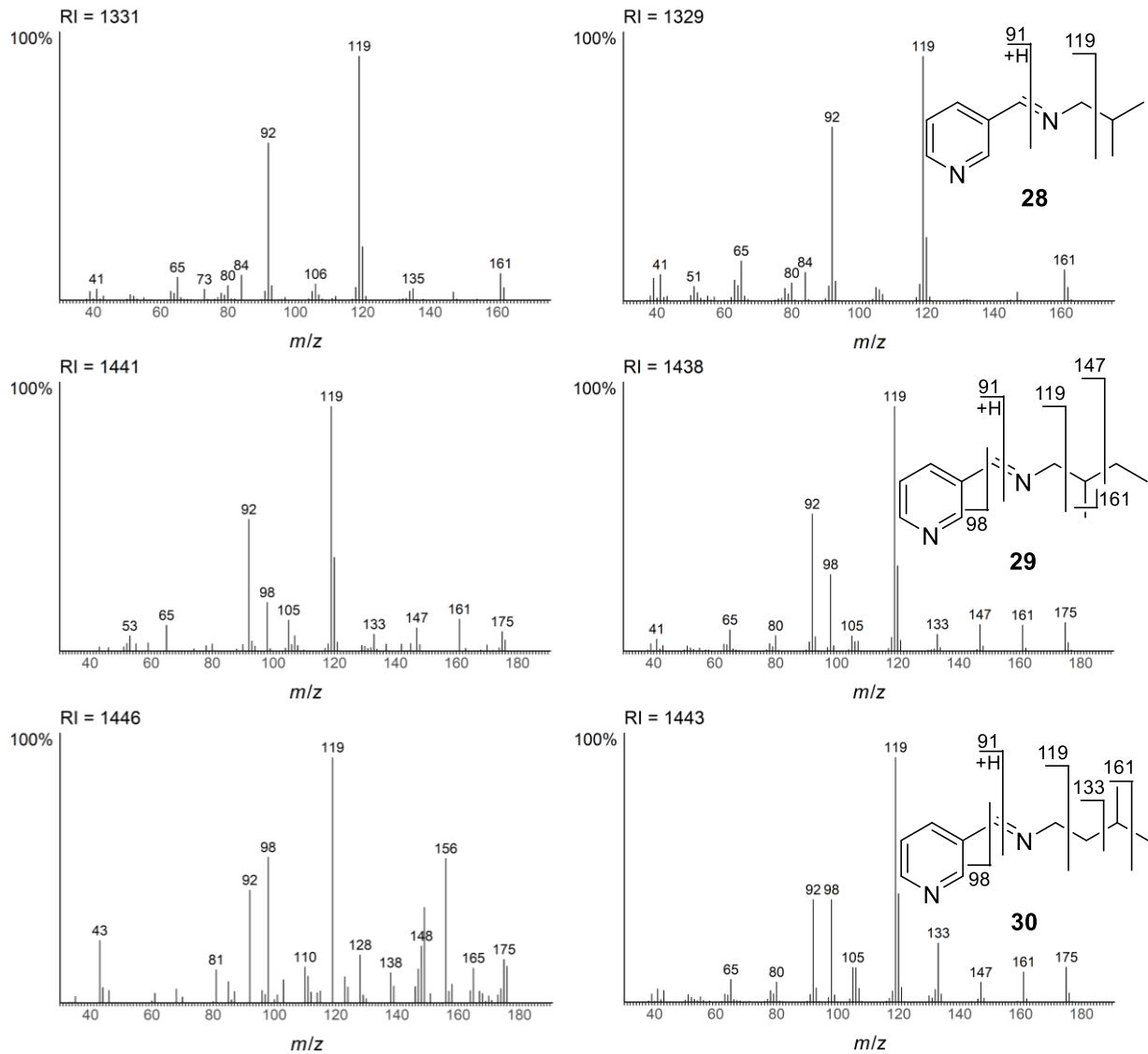
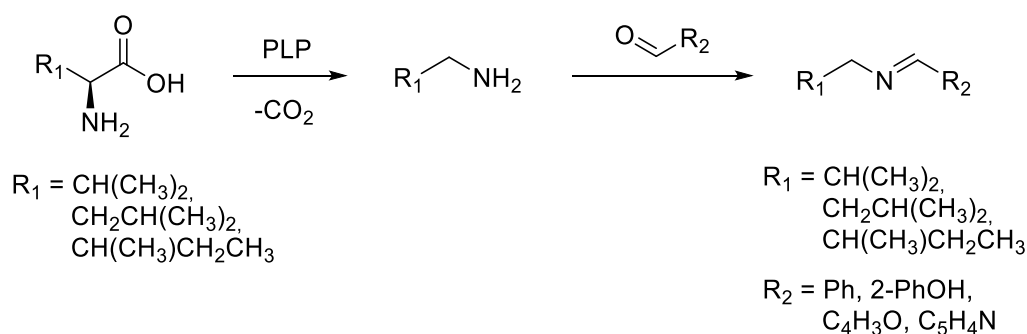


Abbildung 10: Massenspektren der natürlich vorkommenden (links) und synthetischen Imine **28-30** (rechts). Sowohl **29** also auch **30** kommen nur in sehr geringen Konzentrationen vor und werden durch anderen Verbindungen überlagert, sodass keine sauberen Massenspektren erhalten wurden.

Die Imine werden wahrscheinlich aus den Aminen Isobutyl-, Isopentyl- und 2-Methylbutylamin gebildet, welche aus den natürlichen Aminosäuren Valin, Leucin und Isoleucin stammen. Die durch Pyridoxalphosphat (PLP) abhängige Decarboxylierung^[50] erhaltenen Amine können mit biogenen Aldehyden zu den Iminen^[4], auch in nichtenzymatischen Reaktionen, weiterreagieren (Schema 3). Dies würde erklären, warum die Verbindungen auch in einer Reihe anderer Bakterien auftreten.^[44]



Schema 3: Möglicher Imin-Biosyntheseweg aus den Aminosäuren.

Die absolute Konfiguration der 2-Methylbutylimine wurde bisher noch nicht aufgeklärt. Wenn, wie postuliert, die Amine aus den natürlichen Aminosäuren gebildet werden, sollte die verzweigte Methylgruppe eine (S)-Konfiguration besitzen. Um diese Vermutung zu prüfen, wurde **31** aus (S)-2-Methylbutylamin und Benzaldehyd synthetisiert (Schema 2) und anschließend mittels chiraler GC untersucht. Das Totalionenstromchromatogramm der Co-Injektion zeigte eine deutliche Überlagerung der natürlich vorkommenden Verbindung mit der synthetischen Referenz (Abbildung 11). Damit konnte die absolute Konfiguration von **31** zu (S,E)-N-(2-Methylbutyl)-1-phenylmethanimin bestätigt werden. Es wird daher angenommen, dass die weiteren Imine **32**, **33** und **29** ebenfalls eine (S)-Konfiguration besitzen, da diese aus demselben Biosyntheseweg stammen sollten.

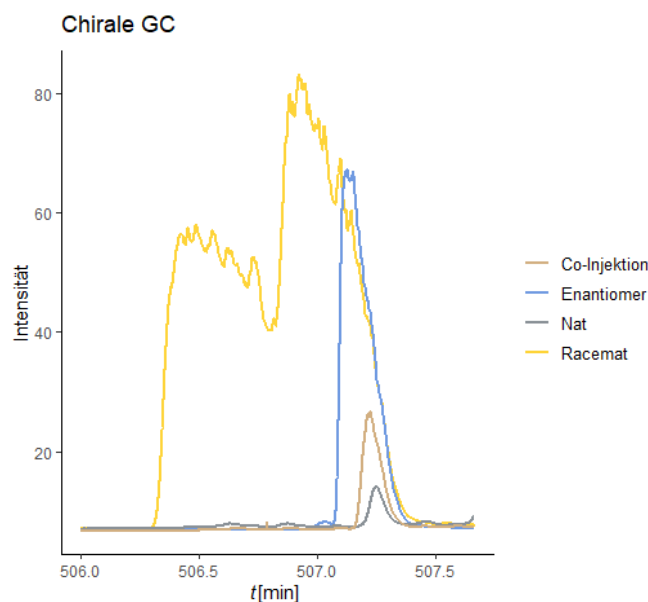


Abbildung 11: Chromatogramme der chiralen GC (β -Dex 255 Kapillarsäule) zur Bestimmung der absoluten Konfiguration von **31**.

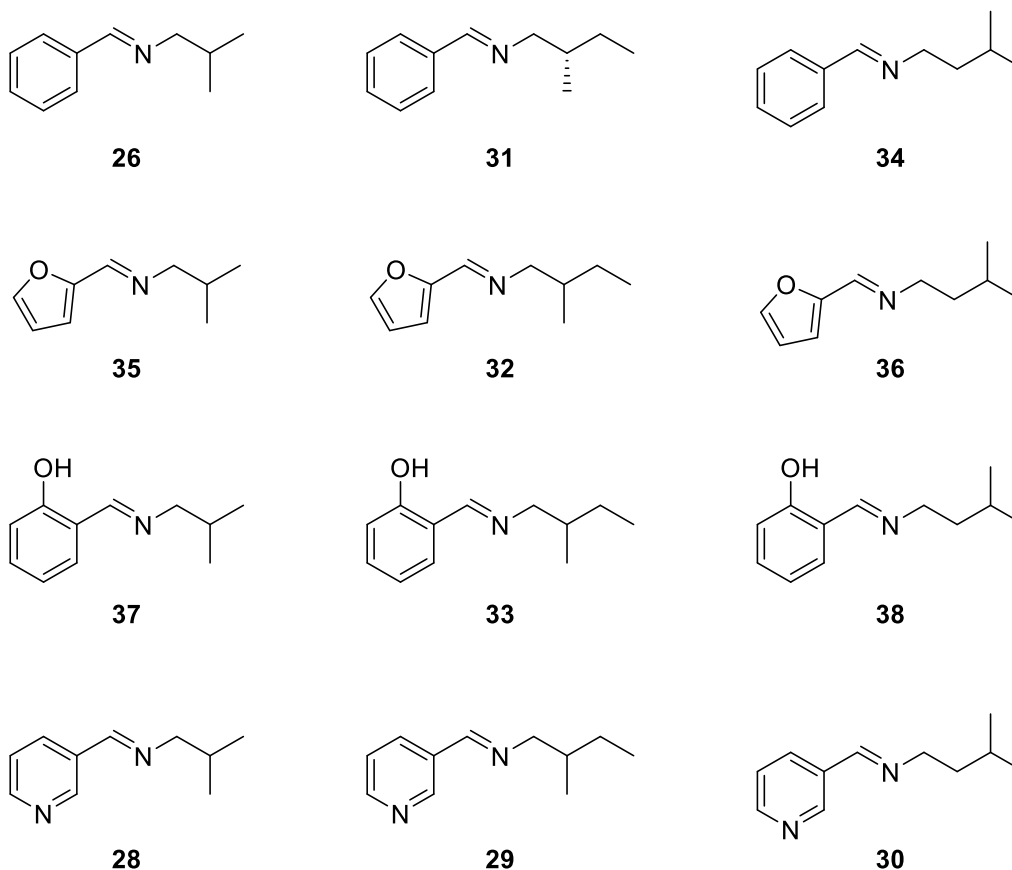
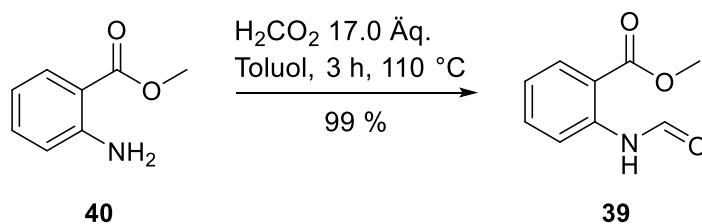


Abbildung 12: Übersicht über die bereits bekannten (**26**, **31-38**) und neuen Imine (**28-30**) aus *S. pacifica* CNS-863.

In einem CLSA-Extrakt einer Plattenkultur aus CNB-440 konnte eine Verbindung in geringen Mengen identifiziert werden, deren Massenspektrum große Ähnlichkeit mit 2-Formamidbenzoesäuremethylester (**39**) aufwies. Da Anthranilsäuremethylester (**40**) sowohl in dieser als auch in anderen Analysen dieses Stamms nachgewiesen werden konnte, wurde die vorgeschlagene Verbindung ausgehend von **40** durch gemeinsames Erhitzen mit Ameisensäure synthetisiert (Schema 4). Massenspektren und Retentionsindices des natürlich vorkommenden und des synthetischen Formamids stimmen überein (Abbildung 13). Die Verbindung **39** ist bisher nicht aus Bakterien bekannt.



Schema 4: Synthese des Formamids **39**.

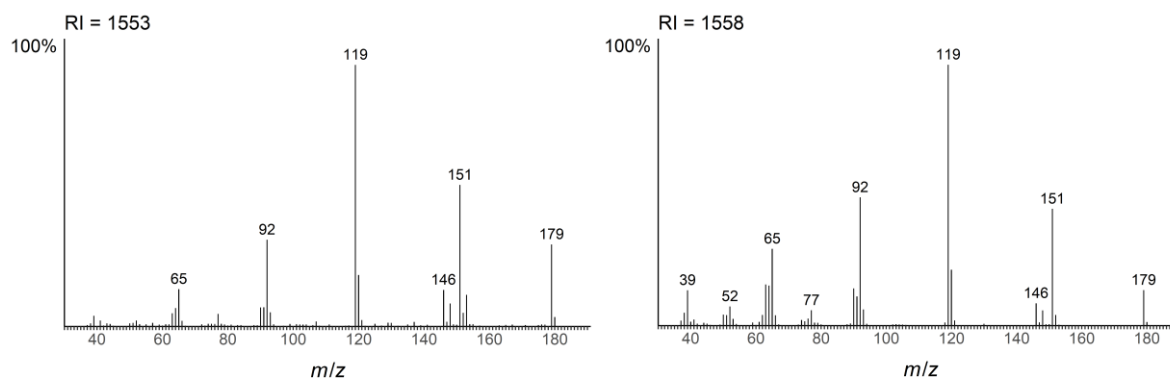


Abbildung 13: Massenspektren des natürlich vorkommenden (links) und synthetischen Formamids **39** (rechts).

3.1.3. Neuer Methylester aus *S. oceanensis* CNT-403

Im CLSA-Extrakt einer Flüssigkultur des *Salinispora*-Stamms CNT-403 wurde die unbekannte Verbindung **B** gefunden. Die Summenformel wurde mittels HRMS zu $C_9H_{14}O_2$ (berechnet 154.09938, gemessen 154.09816) bestimmt. Die Fragment-Ionen $m/z = 95$, 123 zeigen die charakteristischen Abspaltungen eines Methylesters von Methanolat bzw. der Esterfunktion.^[51] Damit verblieben noch sieben Kohlenstoffatome und zwei Unsättigungen in der Alkylkette. Das IR-Spektrum (Abbildung 14) der Verbindung zeigt, eine intensive Carbonylbande bei 1699 cm^{-1} , sowie eine C-O-C-Esterschwingung bei 1259 cm^{-1} .^[52] Weiterhin konnte eine Schwingung bei 1629 cm^{-1} einer α,β -ungesättigten Doppelbindung zugeordnet werden. Daher ist auch keine Fragment-Ion zu sehen, welches durch eine McLafferty-Spaltung^[51] zustande kommt.

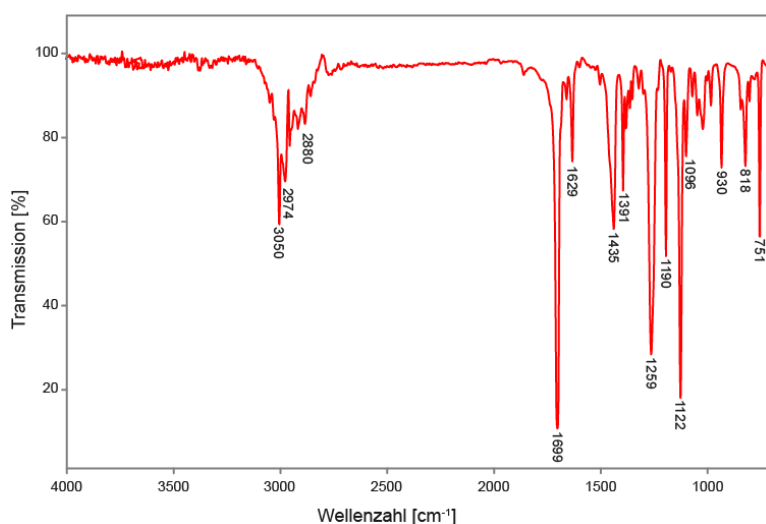
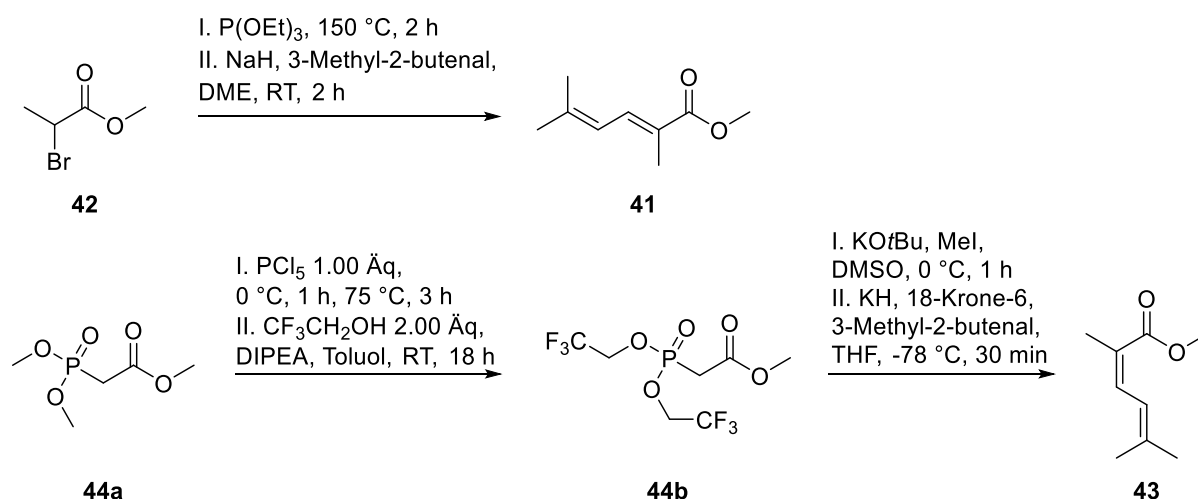


Abbildung 14: IR-Spektrum der unbekannten Verbindung **B**.

Die gesuchte Verbindung muss aufgrund des intensiven Ions $m/z = 139$ mehr als eine Methylverzweigung besitzen. Als erster Strukturvorschlag wurde (*E*)-2,5-Dimethyl-2,4-hexensäuremethylester (**41**) vorgeschlagen. Die Synthese erfolgte ausgehend von 2-

Brompropansäuremethylester (**42**). Dieser wurde in einer ARBUSOW-Reaktion^[53] zunächst in eine Phosphoryl-Spezies überführt und anschließend ohne weitere Aufarbeitung in einer HORNER-WADSWORTH-EMMONS-Reaktion (HWE)^[54] mit 3-Methyl-2-butenal zu **41** umgesetzt (Schema 5). Das Massenspektrum der synthetischen Verbindung stimmt mit dem der unbekannten Verbindung **B** überein, allerdings ist der RI-Wert mit 1223 zu hoch (Abbildung 15). Als Nebenprodukt der Reaktion konnte das (*Z*)-Isomer in Spuren durch GCMS nachgewiesen werden. Das Massenspektrum ist zu dem von **41** identisch, allerdings eluiert die Verbindung früher. Der natürlich vorkommende Methylester sollte daher eine (*Z*)-Konfiguration besitzen. Zur Überprüfung wurde (*Z*)-2,5-Dimethyl-2,4-hexensäuremethylester (**43**) über die STILL-GENNARI-Variante der HWE-Reaktion ausgehend von Trimethylphosphonoacetat (**44a**) hergestellt.^[55,56] Der Retentionsindex des *cis*-Isomers stimmt mit dem des Naturstoffs überein, der damit einen neuen Naturstoff darstellt.



Schema 5: Synthese der Methylester **41** und **43** aus *S. oceanensis* CNT-403.

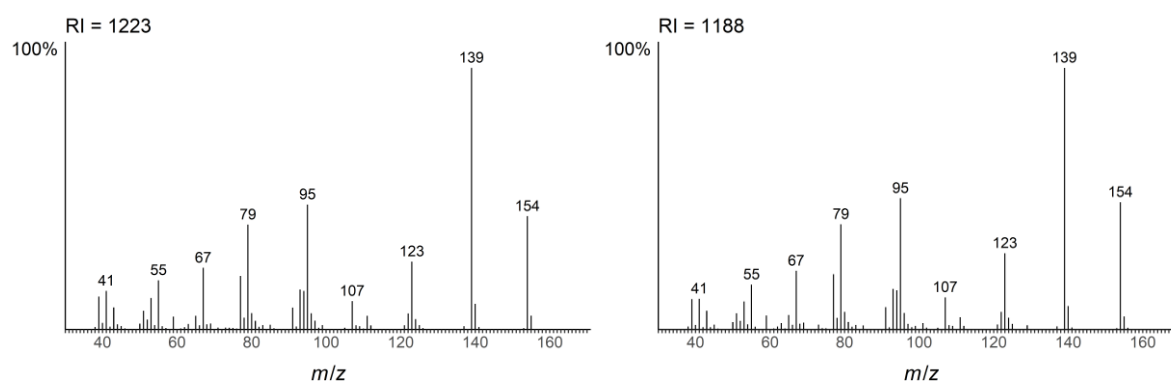


Abbildung 15: Massenspektren des (*E*)-Methylesters **41** (links) und des natürlich vorkommenden (*Z*)-2,5-Dimethyl-2,4-hexensäuremethylesters (**43**) (rechts) aus *S. oceanensis* CNT-403.

3.2. Duftprofilanalyse verschiedener *Salinispora*-Spezies

In den folgenden Kapiteln werden die Ergebnisse der GC/MS-Analysen der einzelnen *Salinispora*-Stämme vorgestellt. Dazu wurden Agarplatten-Kulturen verwendet, die mit der OSSA und CLSA Technik mittels GC/MS untersucht wurden. Die Identifizierung der Substanzen erfolgte durch Analyse der Massenspektren und dem Vergleich der gaschromatographischen Retentionsindices (RI) mit denen von Vergleichsverbindungen. Die Bakterienkulturen wurden auf A1-Medium großflächig ausgestrichen, um ein möglichst dichtes und gleichmäßiges Wachstum zu erhalten. Anschließend wurden die Agarplatten bei 28 °C für mind. drei Tage in den Brutschrank gestellt, bis diese vollständig bewachsen waren. Die flüchtigen Verbindungen wurden danach mittels CLSA für 24 h auf einem Aktivkohlefilter gesammelt und anschließend dreimal mit 20 µL Dichlormethan extrahiert. Um die neue thermische Desorptionseinheit (TDU) für diese Art der Analyse zu testen, wurden von jedem Bakterienstamm zusätzlich drei Replikate angefertigt und die VOCs dann durch OSSA für 6 h auf einem Tenax® TA Filter angereichert. Die flüchtigen Verbindungen wurden anschließend direkt durch die TDU mittels GC/MS analysiert.

3.2.1. *Salinispora arenicola* (CNS-205)

Bei dem aus tropischen marinen Sedimenten isolierten aeroben Bakterium *S. arenicola* CNS-205 handelt es um ein obligates Gram-positives Actinobakterium von beiger Farbe.^[57] Die Verbindungen dieses Bakteriums wurden erstmals von GROENHAGEN^[41] untersucht. Auf eine detaillierte Analyse aller flüchtigen Verbindung wird an dieser Stelle daher verzichtet. Alle identifizierten und nicht identifizierten Verbindungen sind im Anhang (Tabelle 23) zu finden. Im Fokus stehen die bisher noch unbekannten Metabolite. Die Totalionenstromchromatogramm (TICs) der beiden Analysen sind in Abbildung 16 zu sehen.

Durch die Headspace-Analyse mittels TDU konnten erstmals die sehr flüchtigen Verbindungen Isopren (**45**) und 3-Methyl-2-butenal (**46**), die Hydroxyketone 1-Hydroxy-2-propanon (**47**) und Acetoin (**7**), sowie die beiden Diketone 2,3-Butandion (**48**) und 2,3-Pentandion (**49**) in der Gasphase von CNS-205 nachgewiesen werden. Alle diese Verbindungen sind bereits aus Bakterien bekannt.^[4,50] **45** wird wahrscheinlich durch Eliminierung von Wasser aus Prenol (**50**), Isoprenol (**51**) oder Tiglinalkohol (**52**) gebildet, welche ebenfalls in der Gasphase zu finden sind.^[58] **52** ist bisher nicht als bakterieller Duftstoff bekannt, wurde aber bereits im Pinienaroma von *Pinus taeda* und *P. virginiana* beschrieben.^[59] Erstmals konnten so auch die

schwefelhaltigen Verbindungen Butansäure-S-methylthioester (**53**) und 3-Methylbutansäure-S-methylthioester (**54**) nachgewiesen werden. Beide Verbindungen sind bereits aus diversen Actinomyceten bekannt und werden wahrscheinlich biosynthetisch aus Thiomethanol und den entsprechenden Acetyl-CoA Derivaten hergestellt.^[4]

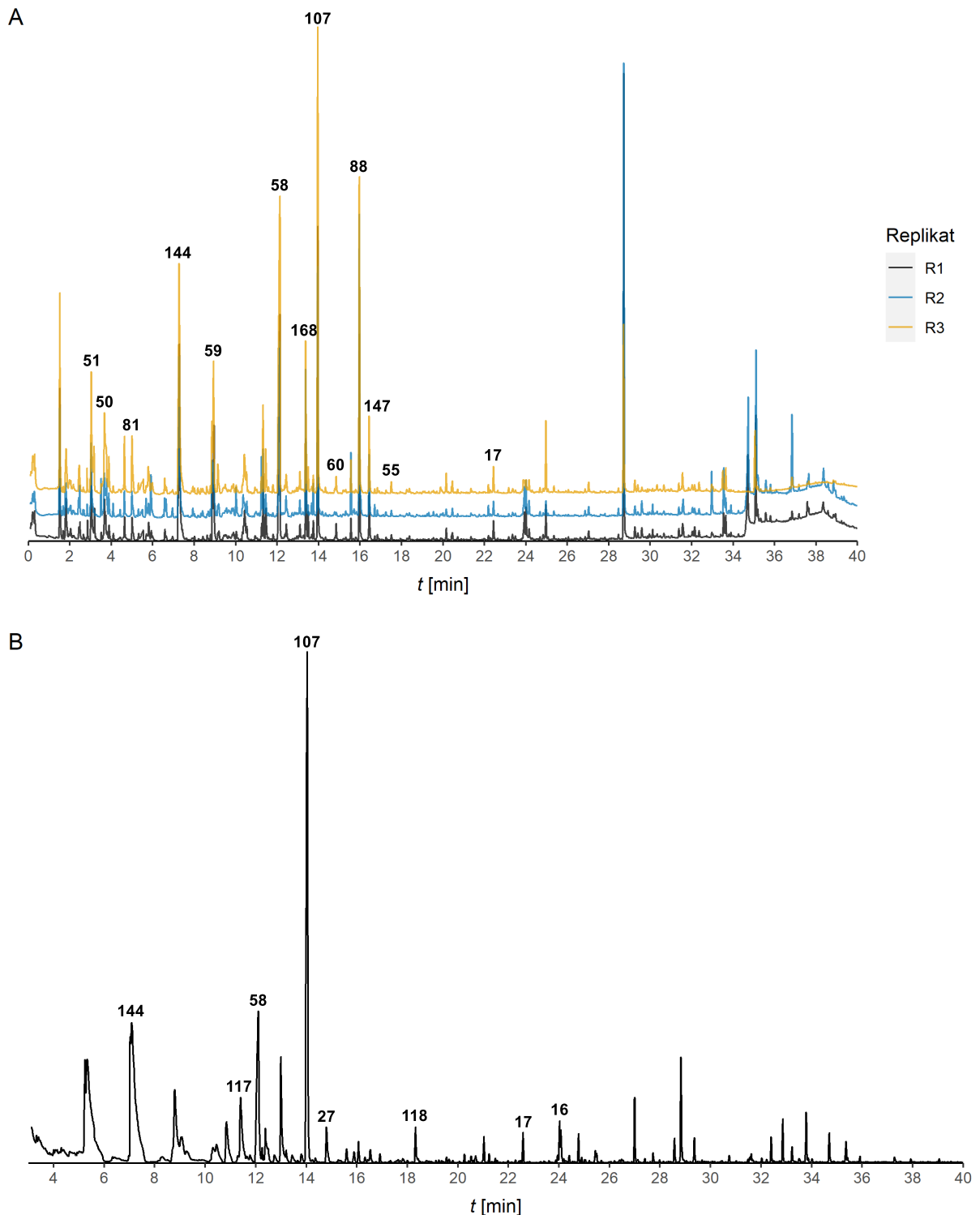


Abbildung 16: Totalionenstromchromatogramme der Ossa (A) und CLSA (B) aus *S. arenicola* CNS-205.

Cyclohexylisothiocyanat (**55**) wurde ebenfalls nur durch OSSA nachgewiesen und ist unter anderem als Stoffwechselprodukt aus dem methanotrophen Bakterium *Methylosinus sporium* bekannt.^[60]

Von den eingangs erwähnten Salinilactonen traten die vier Salinilactone A-C und F (**16-18**, **21**) auf. Neben diesen konnten noch weitere γ -Lactone wie 2- und 3-Methylbutanolid (**56**, **57**) nachgewiesen werden. Beide stammen sehr wahrscheinlich aus den Abbauprodukten 2- und 3-Methylbutansäure, welche bereits aus CNS-205 bekannt sind.^[4,41] Eine weitere interessante Verbindung war die unbekannte Verbindung **C**, die ebenfalls bereits von GROENHAGEN^[41] in einem Extrakt gefunden und sowohl hier mit Hilfe von CLSA als auch OSSA nachgewiesen werden konnte. Da es sich um eine der Hauptkomponenten des gesamten Duftprofils handelt, ist die Identifizierung von besonderem Interesse. Das Massenspektrum (Abbildung 18) zeigt einen Molpeak bei $m/z = 115$, was auf eine stickstoffhaltige Verbindung schließen lässt, sowie ein Fragment $[M-17]^+$, welches zunächst als eine Abspaltung einer NH_3 -Gruppe gedeutet wurde.^[41] Durch die Messung eines hochaufgelösten Massenspektrums (HRMS gemessen 115.06210, berechnet 115.06333) konnte die Summenformel zu $C_5H_9NO_2$ bestimmt werden. Das Fragment $[M-17]^+$ ist durch die Abspaltung einer OH-Gruppe zu erklären. Zusätzlich konnten die Fragmente $m/z = 57$, 86 als Abspaltung einer Ethyl-Seitenkette bzw. eines Ethylketones bestätigt werden. Abspaltungen von Hydroxygruppen sind in Alkoholen oft durch den Verlust von Wasser gekennzeichnet.^[51] Bei Oximen hingegen kann es zur Abspaltung der reinen Hydroxygruppe kommen.^[26] Zusammen mit der weiteren Unsattheit ergab dies 2-(Hydroxyimino)pentan-3-on (**58**) als Strukturvorschlag. Durch die Messung eines IR-Spektrums (Abbildung 17) konnte dieser Vorschlag noch weiter unterstützt werden. Die intensiven Banden bei 1672 cm^{-1} und 1014 cm^{-1} wurden einem Keton sowie der $C=N$ Doppelbindung eines Oxims zugeordnet.^[52] Zudem konnte keine NH-Schwingung beobachtet werden.

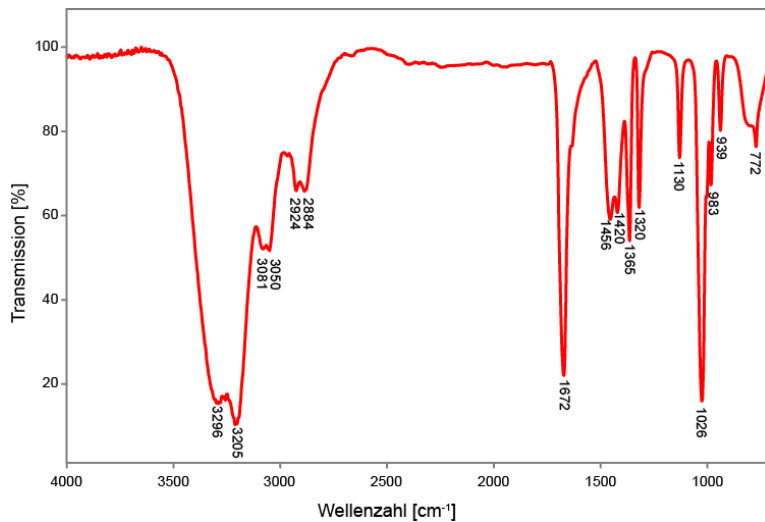
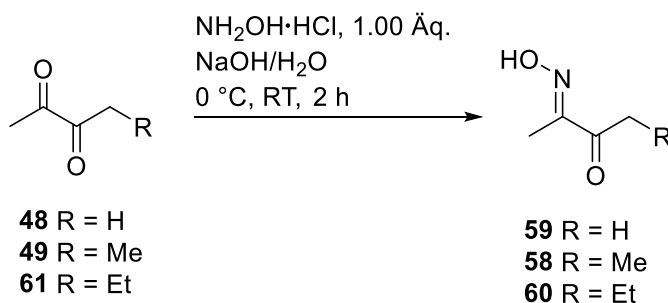


Abbildung 17: IR-Spektrum der unbekannten Verbindung **C**.

Die Verbindung wurde ausgehend von 2,3-Pentandion (**49**) durch Umsetzung mit Hydroxylamin Hydrochlorid hergestellt (Schema 6). Synthetisch entstand dabei fast ausschließlich das *trans*-Isomer, wie durch die Aufnahme eines $^1\text{H},^1\text{H}$ -COSY Spektrums bestätigt wurde. Die Massenspektren und Retentionsindices der synthetischen Verbindung und des Naturstoffs stimmen überein (Abbildung 18). Es wird daher auch für die natürlich vorkommende Verbindung eine (*E*)-Konfiguration angenommen. Der Strukturvorschlag ist damit bestätigt.



Schema 6: Synthese der unverzweigten Oxime **58-60**.

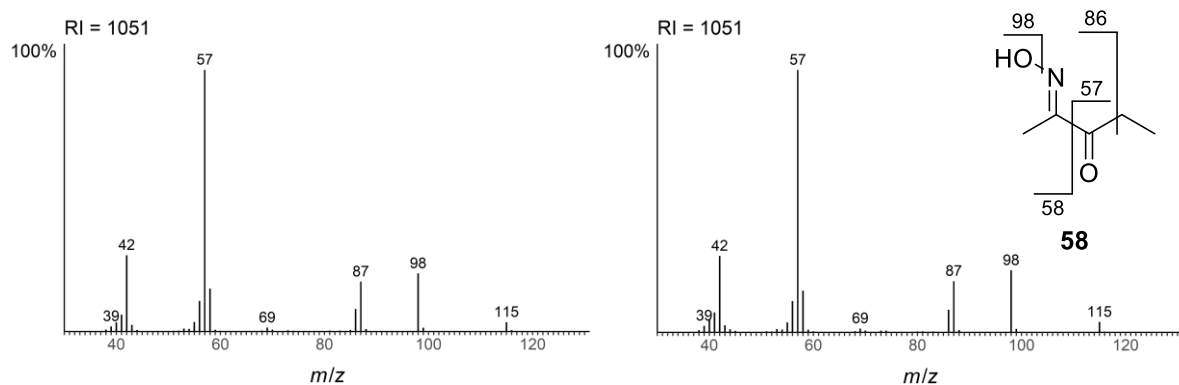
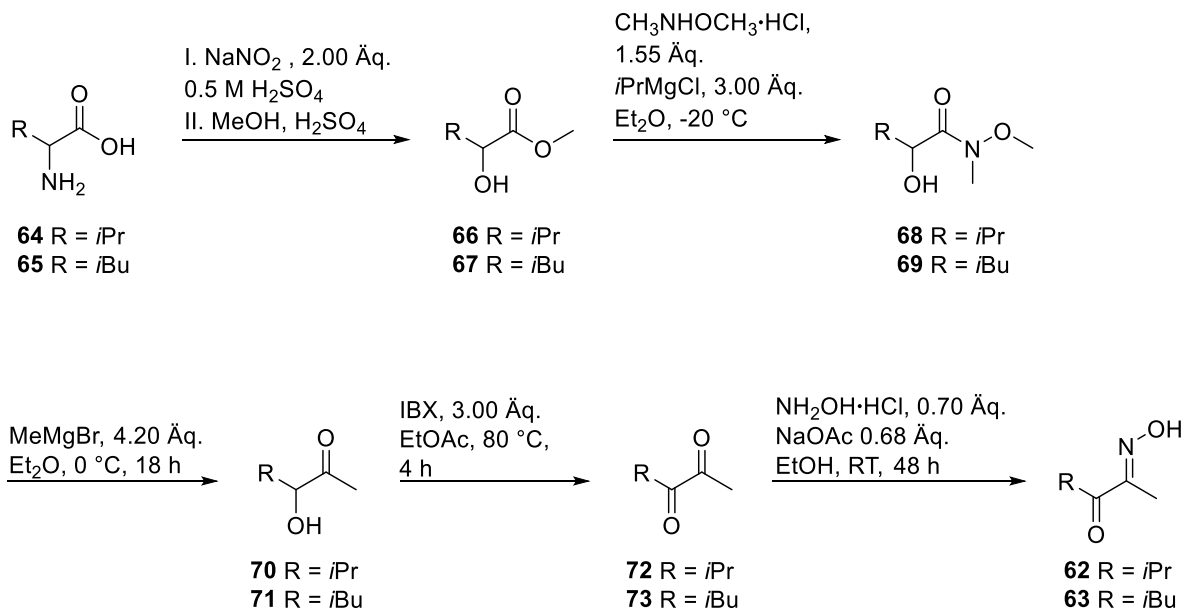


Abbildung 18: Massenspektrum der unbekannten Verbindung **C** (links), des Syntheseprodukts **58** (rechts), sowie Strukturvorschlag mit Fragmentierung.

Das um einen Kohlenstoff kürzere Oxim **59** war bereits aus CNS-205 bekannt.^[41] Zusätzlich konnte noch die unbekannte Verbindung **D** mit einem RI = 1140 als (*E*)-2-(Hydroxyimino)hexan-3-on (**60**) identifiziert werden. Beide Verbindungen wurden ebenfalls durch Umsetzung der korrespondierenden Diketone **48** und **61** synthetisiert. Durch die höhere Sensitivität der OSSA für sehr flüchtige Verbindungen wurden zusätzlich noch zwei weitere Verbindungen gefunden, deren Massenspektren den der bereits identifizierten Oximen ähnelten, jedoch eine Abweichung im Retentionsindex von ~50 besaßen. Dies deutet auf eine endständige Methylverzweigung in der Seitenkette hin.^[61] Die beiden Oxime (*E*)-2-(Hydroxyimino)-4-methylpentan-3-on (**62**) und (*E*)-2-(Hydroxyimino)-5-methylhexan-3-on (**63**) wurden ausgehend von den entsprechenden Aminosäuren synthetisiert (Schema 7). Dabei wurden die Aminosäuren **64** und **65** zunächst in zwei Stufen über die Hydroxycarbonsäuren in die Methylester **66** und **67** umgewandelt. Über die Weinrebamide **68** und **69** wurden im Anschluss die Methylketone **70** und **71** synthetisiert. Nach Oxidation und letztllicher Umsetzung mit Hydroxylamin Hydrochlorid wurden die Oxime **62** und **63** erhalten. Wie zu erwarten stimmen die Massenspektren der synthetischen Verbindungen mit denen der Naturstoffe überein (Abbildung 19). Bis auf **59**, welches als Geruchsstoff aus grünem Tee bekannt ist^[62], waren die Oxime als Naturstoffe noch unbekannt. **63** ist das einzige C₇-Oxim, das als Komponente im Duftprofil von *Salinispora*-Bakterien auftritt. Unverzweigte C₇-Oxime konnten noch nicht gefunden werden. Biosynthetische Untersuchungen sind bisher noch nicht erfolgt. Die Oxime werden wohl nicht-enzymatisch aus den Diketonen gebildet werden. Die verzweigten Oxime **62** und **63** haben ihren Ursprung voraussichtlich in den Aminosäuren Valin (**64**) und Leucin (**65**).



Schema 7: Synthese der methylverzweigten Oxime **62** und **63**.

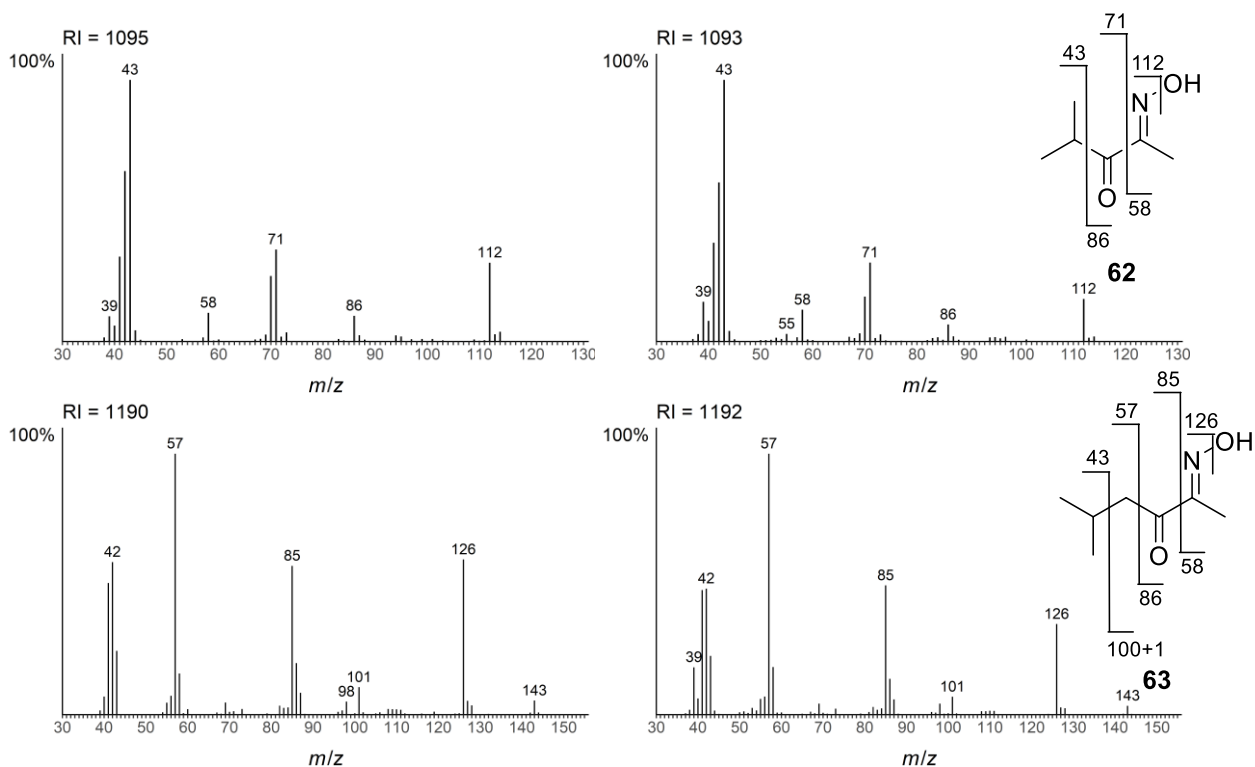
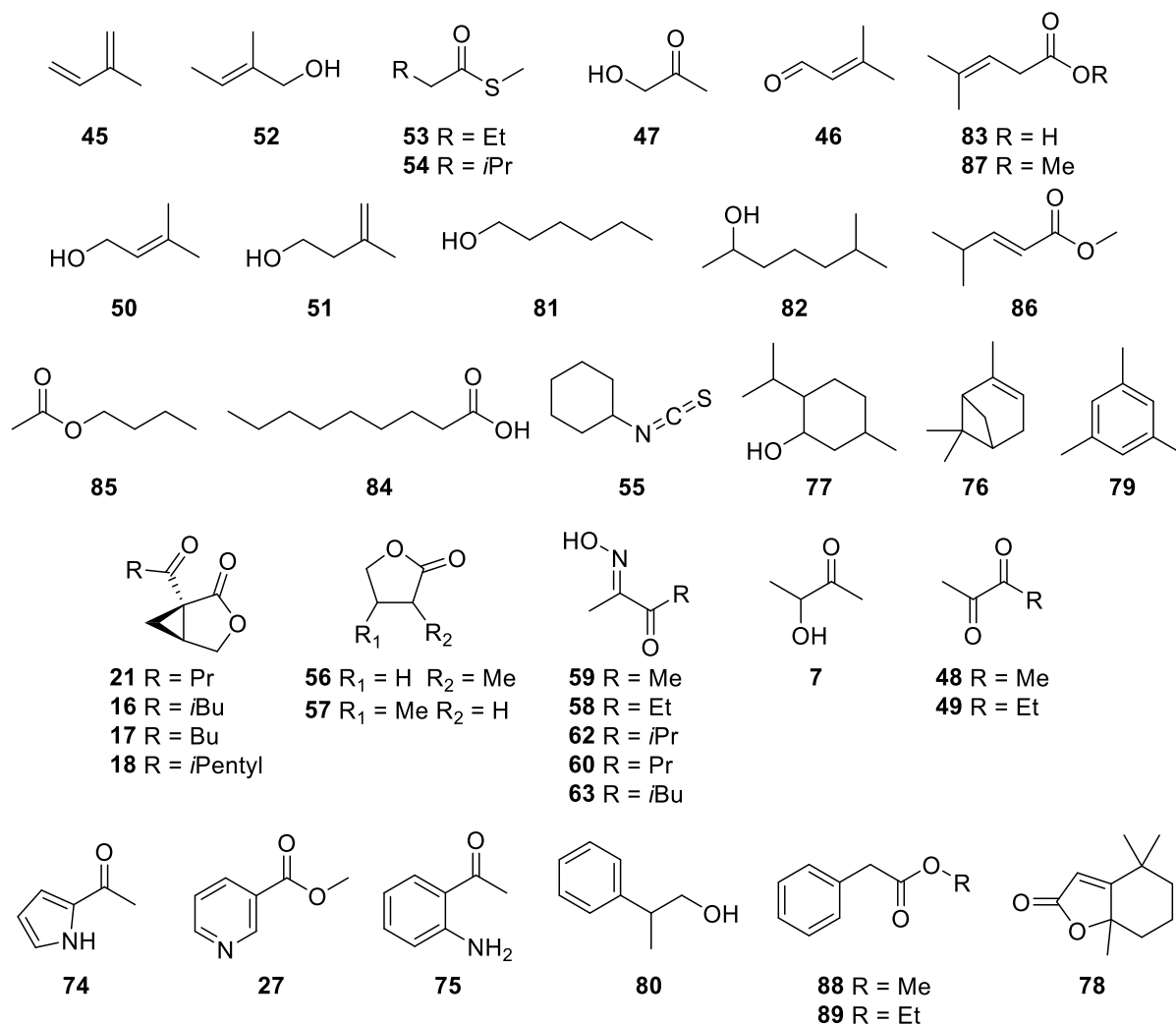


Abbildung 19: Massenspektren der natürlich vorkommenden (links) und synthetischen (rechts) Oxime **62** und **63**, sowie deren Fragmentierungsmuster.

Als weitere stickstoffhaltige Verbindungen konnte 2-Acetylpyrrol (**74**), 2-Acetylanilin (**75**) und Nicotinsäuremethylester (**27**) nachgewiesen werden. **74** ist als Geruch in fermentierter Kakaobohnen bekannt.^[63] Da die Verbindung auch in den CLSA Blindproben zu finden war, jedoch nicht in denen der Replikate der OSSA

Kontrollversuche, ist die Identifizierung nicht eindeutig. Dasselbe gilt für die aromatische Verbindung **75**, die bereits aus *Myxococcus xanthus*^[64] bekannt ist. Der Methylester **27** ist aus *Mycobacterium tuberculosis* bekannt, wo er als Marker für eine Infektion diskutiert wurde.^[65]

Des Weiteren konnten noch die Terpene α -Pinen (**76**), Menthol (**77**), das Norcarotenoid Dihydroactinidiolid (**78**), einige aromatische Verbindungen wie 1,3,5-Trimethylbenzol (**79**) und 2-Phenyl-1-propanol (**80**), die aliphatischen Alkohole 1-Hexanol (**81**) und 6-Methyl-2-heptanol (**82**), sowie die Carbonsäuren 4-Methyl-3-pentensäure (**83**) und Nonansäure (**84**) identifiziert werden. Weiterhin traten die Ester Essigsäurebutylester (**85**), 4-Methyl-2-pentensäuremethylester (**86**), 4-Methyl-3-pentensäuremethylester (**87**), Phenylelessigsäuremethylester (**88**) und Phenylelessigsäureethylester (**89**) auf. **76** ist unter anderem aus *Streptomyces griseus* bekannt.^[66] Das Norcarotenoid **78** wird von sowohl *Stigmatella aurantiaca* also auch diversen Bacteroidetes Bakterien produziert.^[4,67] Das Monoterpen **77** tritt neben diversen anderen Terpenen ebenfalls in *S. aurantiaca* auf.^[68] Aromatische Kohlenwasserstoffe wie **79** sind bereits als Naturstoffe bekannt.^[69] **80** ist noch nicht bekannt, könnte aber als Oxidationsprodukt von Propylbenzol entstanden sein, welches u.a. auch in *C. pinensis* gefunden wurde.^[50] Alkohole wie **81** und **82** sind in Bakterien verbreitet und stammen aus der Fettsäurebiosynthese.^[4,50] Dasselbe gilt auch für die Carbonsäuren **83** und **84**, sowie die Ester **85**, **86** und **87**. Sowohl **83**, als auch die beiden Methylester **86** und **87** sind bereits von GROENHAGEN in *S. tropica* CNB-440 beschrieben worden.^[41] Bei **86** handelt es sich möglicherweise um ein Umlagerungsprodukt aus **87**, welches auch im Duft der Chrysantheme *Dendranthema indicum* nachgewiesen werden konnte.^[70] Der Ethylester **89** ist ein Derivat des bereits in *S. arenicola* und diversen anderen Bakterien nachgewiesenen Methylesters **88**.^[4,41] Neben den hier diskutierten Verbindungen konnten noch einige unbekannte Verbindungen in der Gasphase von *S. arenicola* CNS-205 gefunden werden. Hierbei handelt es sich aber hauptsächlich um Verbindungen, die nur in sehr geringen Konzentrationen vorkommen ($\leq 0.1\%$). Daher war eine weitere Analytik dieser Substanzen nicht möglich. Die Zusammensetzung des Geruchsprofils (Abbildung 20) konnte somit fast vollständig aufgeklärt werden.

Abbildung 20: Strukturen flüchtiger Substanzen aus *S. arenicola* CNS-205.

3.2.2. *Salinispora tropica* (CNB-440)

S. tropica CNB^T-440 ist ein Gram-positives marines Bakterium von orangener Farbe und wurde erstmals aus Sedimenten auf den Bahamas isoliert.^[71] Es ist der Typenstamm für *S. tropica* und eine ausführliche Analyse der flüchtigen Komponenten erfolgte bereits durch GROENHAGEN^[41]. Auf eine detaillierte Analyse aller flüchtigen Verbindung wird an dieser Stelle daher ebenfalls verzichtet. Alle identifizierten und nicht identifizierten Verbindungen sind im Anhang zu finden (Tabelle 24). Im Fokus stehen die bisher noch unbekannte Metabolite aus diesem Bakterium. Erstmals konnten mit Hilfe der TDU auch in CNB-440 die flüchtigen Verbindungen **7**, **45-47**, **50** und **51** nachgewiesen werden, die bereits im vorherigen Kapitel diskutiert wurden. Ebenso traten die beiden Salinilactone A und B (**16**, **17**), als auch die neu identifizierten unverzweigten Oxime **58-60** auf (Abbildung 21).

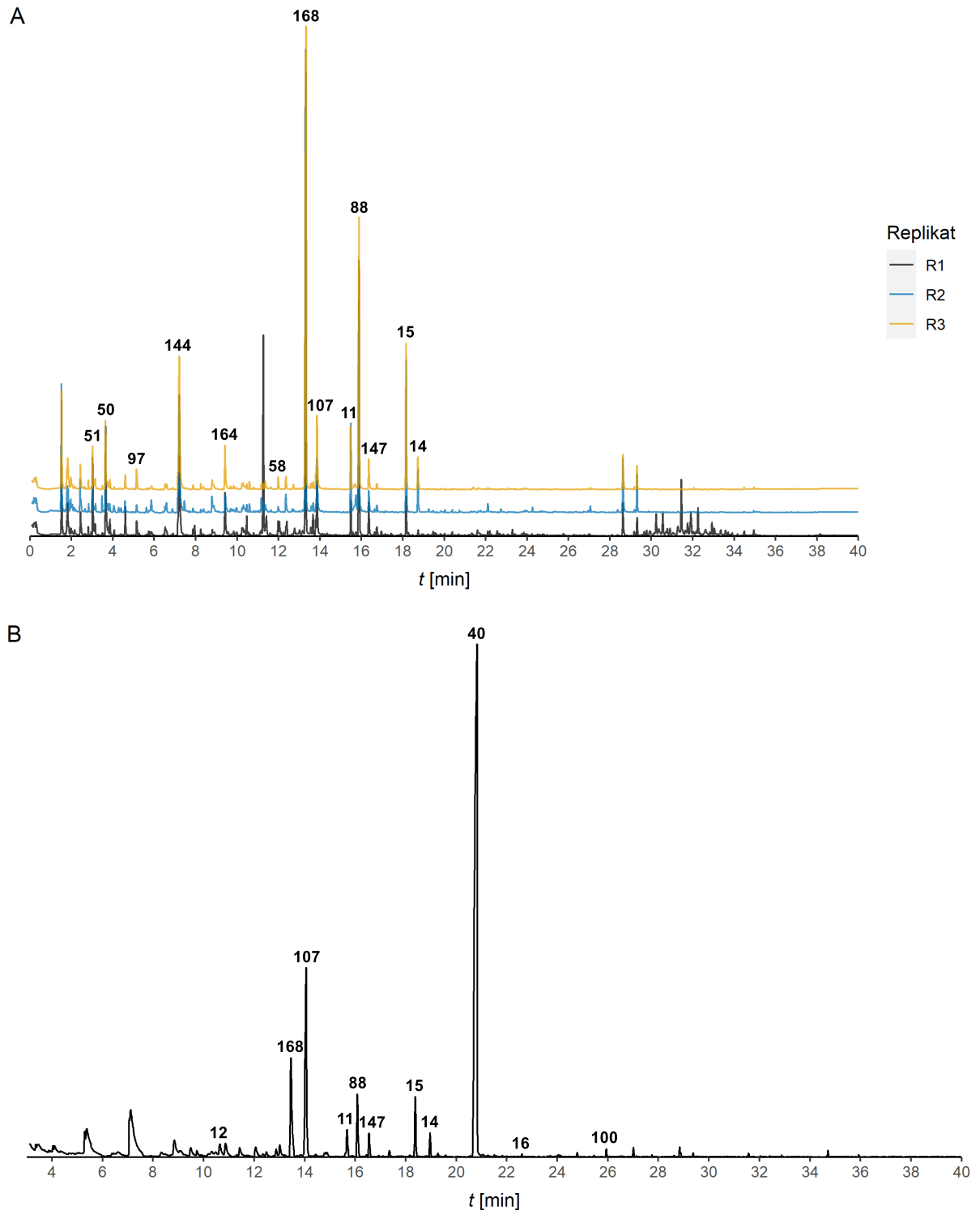


Abbildung 21: Totalionenstromchromatogramme der OSSA (A) und CLSA (B) aus *S. tropica* CNB-440.

Die Konzentrationen dieser Verbindungen sind jedoch geringer als vergleichsweise in CNS-205 und waren darüber hinaus teilweise nur in den CLSA-Analysen zu finden. Besonders bemerkenswert ist die Produktion von Anthranilsäuremethylester (**40**), welches die Hauptkomponente im CLSA Extrakt ausmacht, jedoch nicht mittels OSSA nachgewiesen werden konnte. Der Grund für diese Unterschiede ist nicht bekannt. Der

Ester **40** ist sowohl aus diversen Pflanzen als auch aus *Haliangium ochraceum* bekannt.^[50]

Neben den bereits von GROENHAGEN^[41] beschriebenen Verbindungen, speziell die Cyclohexenyl-Derivate **10-15**, konnten zusätzlich noch einige neue Verbindungen für diesen Stamm identifiziert werden (Abbildung 22). Dazu zählen die Alkohole 1-Butanol (**90**), 1-Heptanol (**91**) sowie 2,6-Dimethylcyclohexanol (**92**) und Nicotinyalkohol (**93**). Primäre Alkohole wie **90** und **91** sind bereits aus diversen Bakterien bekannt.^[50,4] **92** ist bisher nicht aus Bakterien bekannt, wohl aber als Abbauprodukt aus β -Ionon und β -Cyclocitral.^[72] **93** ist zwar als Naturstoff bekannt, bisher jedoch nicht als bakterieller Duftstoff. Zusätzlich konnten noch die beiden Hydroxyketone 2-Hydroxy-3-hexanon (**94**) und 2-Hydroxy-5-methylhexan-3-on (**95**) neben dem bereits aus CNS-205 beschriebenen und bekannten 2-Hydroxy-3-pentanon (**96**)^[41] gefunden werden. Hydroxyketone sind weit verbreitet und konnten als Vorläufer alkylierter Pyrazine in *Corynebacterium Glutamicum* nachgewiesen werden.^[73] Die strukturelle Ähnlichkeit zu den Oximen ist ein Hinweis auf eine gemeinsame Biosynthese.

Neben diesen Verbindungen konnten noch einige in ω -1-Position methylverzweigte Carbonsäureester wie 3-Methyl-2-butensäuremethylester (**97**), **86** und **87** identifiziert werden. Neben Anthranilsäuremethylester (**40**) waren noch weitere aromatische Ester wie Zimtsäuremethylester (**98**), *p*-Methoxybenzoesäuremethylester (**99**), 2-Amino-2-methoxybenzoesäuremethylester (**100**) und 3-Methyl-2-furansäuremethylester (**101**) in den Extrakten enthalten. **98** ist zwar als Aromastoff aus diversen Pflanzen und Ölen bekannt^[74], nicht jedoch aus Bakterien. Biosynthetisch stammt es wohl aus dem Abbau von Phenylalanin.^[4] **99** ist aus dem Myxobakterium *Chondromyces crocatus* bekannt und diverse Biosynthesewege wurden vorgeschlagen.^[4] **100** kommt in den Samen des Schwarzkümmels *Nigella damascena* vor.^[75] 2-Hydroxy-5-methoxybenzoesäuremethylester (**102**) und diverse Isomere wurden lediglich als Antifraßmittel gegen den Fichtenrüsselkäfer *Hylobius abietis* diskutiert.^[76]

Auch einige neue schwefelhaltige Verbindungen konnten erstmals in den untersuchten Extrakten entdeckt werden. Neben der bereits vorgestellten schwefelhaltigen Verbindung **53** konnten noch 2- bzw. 3-Thiophencarbonsäuremethylester (**103**, **104**) sowie Hexanthiol (**105**) nachgewiesen werden. **103** tritt in dem Actinobakterium *Stackebrandtia nassauensis* auf. **104** ist bisher noch nicht bekannt, jedoch konnte das Furananalog 3-Furancarbonsäuremethylester bereits in *Streptomyces griseoflavus* gefunden werden.^[50] **105** konnte bisher nicht aus bakteriellem Ursprung nachgewiesen

werden. Es könnte ein Abbauprodukt des im Medium vorkommenden Dihexyldisulfids sein. So ist *Rhodococcus erythropolis* in der Lage, diverse schwefelhaltige Verbindungen aus Kraftstoffen zu verstoffwechseln.^[77] Furanderivate wie **101** und 5-(Methoxymethyl)furan-2-carbonsäuremethylester (**106**) sind bereits aus Bakterien bekannt.^[4,44,50] Neben einigen wenigen unbekannten Verbindungen, welche nur in geringen Konzentrationen vorkommen, konnten alle Bestandteile des Duftprofils von CNB-440 identifiziert werden.

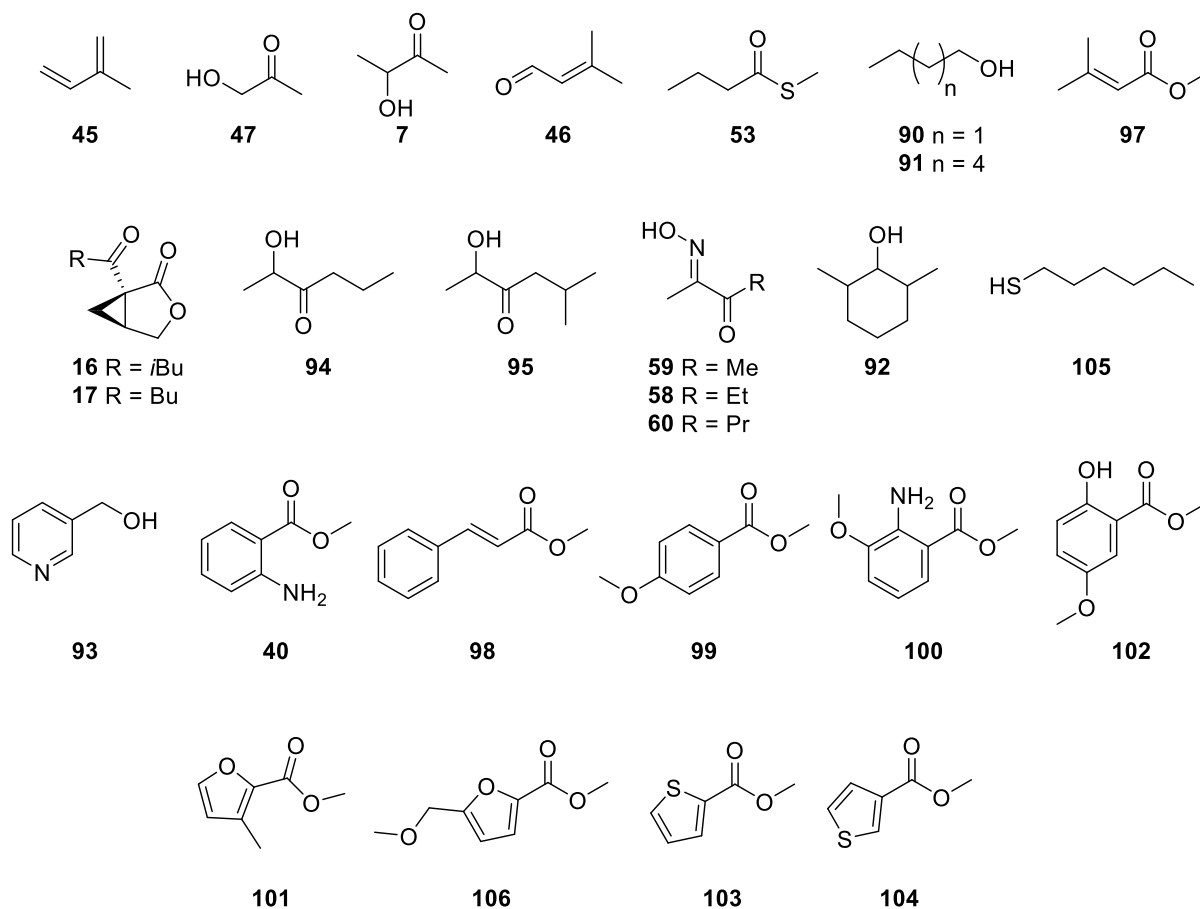


Abbildung 22: Strukturen neuer flüchtiger Substanzen aus *S. tropica* CNB-440.

3.2.3. *Salinispora arenicola* (CNH-643)

Bei *S. arenicola* CNH-643 handelt es sich um ein Gram-positives marines Bakterium und den Typenstamm dieser Gattung. Es hat eine intensive orangene Farbe und wurde erstmals aus marinen Sedimenten von den Bahamas isoliert.^[34] Obwohl schon einige Veröffentlichungen sich mit der Produktion von nicht flüchtigen Verbindungen des Bakteriums beschäftigten, stand eine Analyse des Geruchsprofils noch aus.

Im Vergleich zum bereits diskutierten Stamm CNS-205 produziert der Typenstamm weniger flüchtige Metabolite. Zu den zwei Hauptkomponenten gehören der in Bakterien weit verbreitete Phenylethylalkohol (**107**)^[4] und das Oxim **58**, welches auch schon im verwandten Stamm CNS-205 eine der Hauptkomponenten darstellte (Abbildung 23).

Daneben konnten auch noch die Oxime **59**, **60** und **63** in geringeren Konzentrationen identifiziert werden. Als potenzielle Vorläufer der Oxime kommen die Hydroxyketone 3-Hydroxy-2-pentanon (**108**), **96**, sowie das Diketon **49** vor. Ebenfalls konnten die sechs Salinilactone A-D, F-G (**16-19**, **21-22**) nachgewiesen werden, wovon **16** und **17** in besonders großen Mengen produziert werden. Viele der von CNH-643 produzierten VOCs stammen aus der Fettsäurebiosynthese.^[4] Dazu zählen die Alkohole **51**, 1-Pentanol (**109**), **81**, **82**, **91**, die Ketone 3-Heptanon (**110**), 4-Methyl-3-hexanon (**111**) und 6-Methyl-2-heptanon (**112**), sowie die Carbonsäuren 2-Methylpropansäure (**113**), 2- und 3-Methylbutansäure (**114**, **115**), Tiglinsäure (**116**) und **83**. Weitere bereits aus diversen Bakterien bekannte Verbindungen sind Benzylalkohol (**117**), Geraniol (**118**), Benzothiazol (**119**), Acetylfuran (**120**) und 2-Ethyl-5-methylpyrazin (**121**).^[4,50] β -Ionon (**122**), **78** und **92** sind ebenfalls bekannt und stammen sehr wahrscheinlich aus dem Abbau des Pigments Sioxanthin, welches für die orange Färbung des Bakteriums verantwortlich ist.^[78] Es konnten zudem die zwei langkettigen Alkohole 1-Tridecanol (**123**) und 9-Methyl-1-decanol (**124**) identifiziert werden. Alkohole wie 1-Decanol und 1-Dodecanol haben eine antimikrobielle Wirkung und sind bisher nur aus magensaftresistenten Bakterien bekannt.^[79] Daneben konnte noch 2-Methyldodecansäuremethylester (**125**) sowie einige kurzkettige γ - und δ -Lactone wie **126**, **127**, **128** und **129** nachgewiesen werden. Lactone sind als Signalmoleküle für die Zell-zu-Zell-Kommunikation in diversen Streptomyceten bekannt.^[9,80,81] Bei den gefundenen Lactonen könnte es sich unter anderem um Abbau- und Nebenprodukte dieser Signalmoleküle handeln.

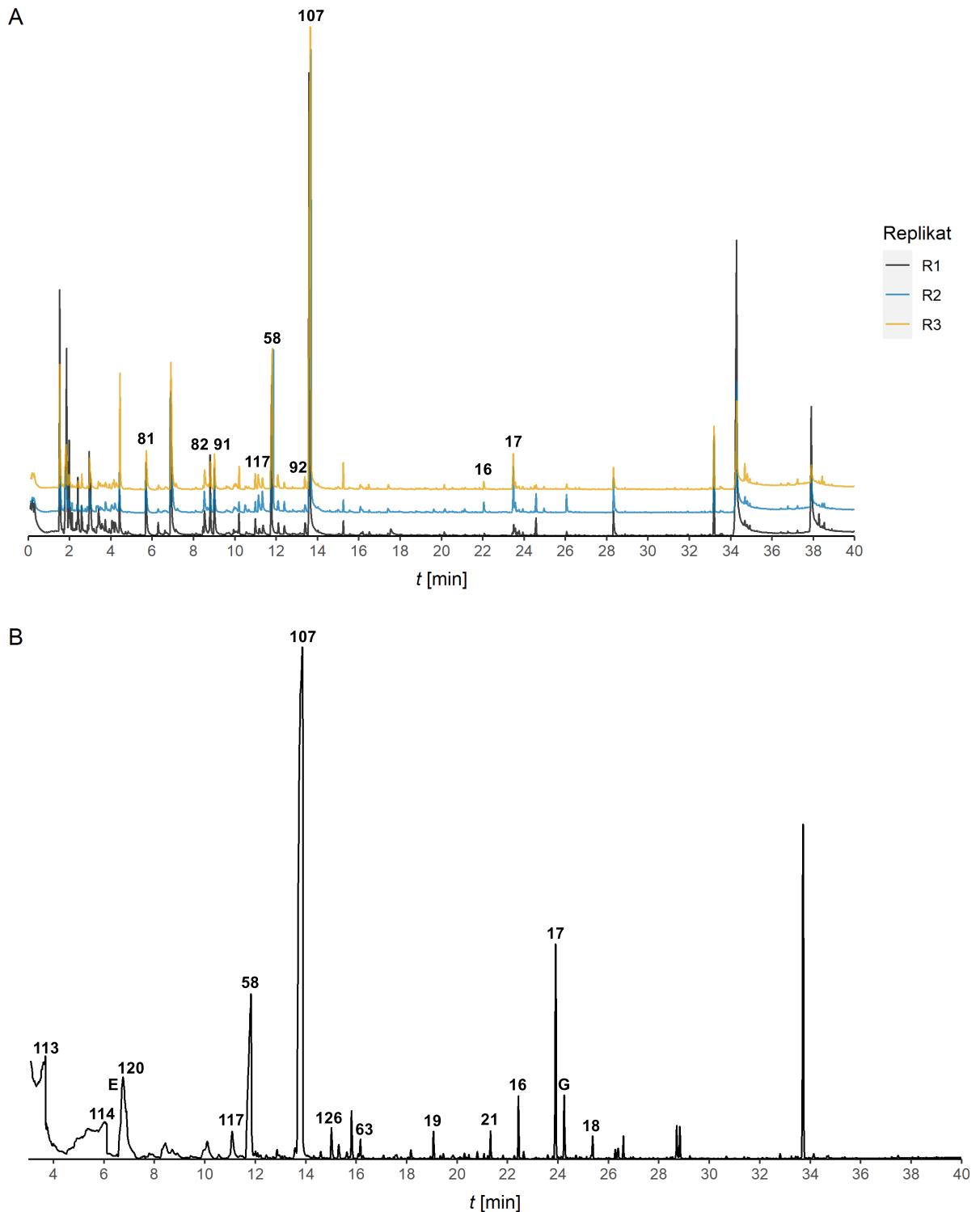


Abbildung 23: Totalionenstromchromatogramme der OSSA (A) und CLSA (B) aus *S. arenicola* CNH-643.

Spiroverbindungen wie Conophthorin und Chalcogran kommen in einigen Actinomyceten^[50] vor und sind zudem als Pheromone der Wespe *Paravespula vulgaris*^[82] und dem Käfer *Pityogenes chalcographus*^[83] bekannt. 1,7-Dioxaspiro[5.5]undecan (**130**) ist das Sexualpheromon der Olivenfruchtfliege

Bactrocera oleae^[84] und konnte bereits von GROENHAGEN^[41] in *S. tropica* CNB-440 gefunden werden.

Neben einigen weiteren unbekannten Verbindungen wie langkettigen Methylestern, Alkoholen und Ketonen konnte der Großteil der volatilen Verbindungen aufgeklärt werden (Tabelle 2). Eine Übersicht der produzierten VOCs ist in Abbildung 25 zu sehen. Für die unbekannten Verbindungen **E**, **F** und **G** blieb eine Strukturaufklärung aufgrund der geringen Mengen bisher erfolglos (Abbildung 24). **F** und **G** wurden in Spuren bereits in CNS-205 gefunden. Neben den genannten Verbindungen konnten keine neuen Naturstoffe aufgeklärt werden.

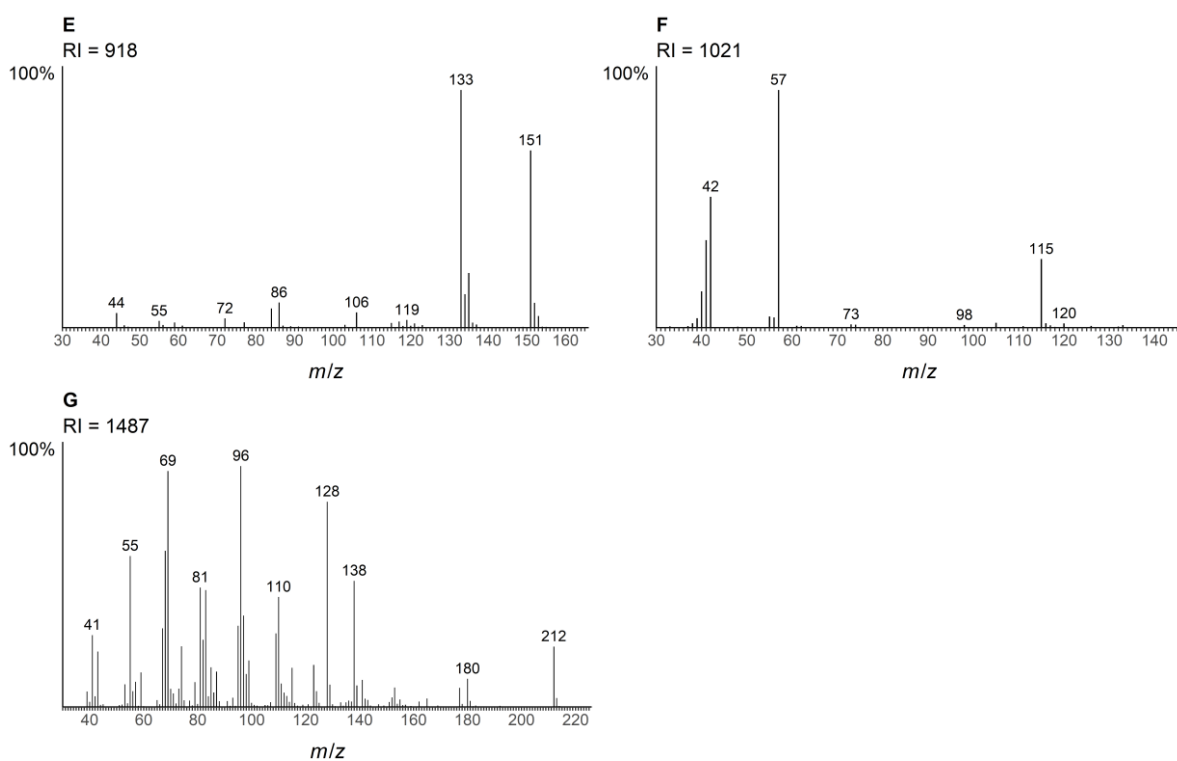


Abbildung 24: Massenspektren der unbekannten Verbindungen **E** – **G**.

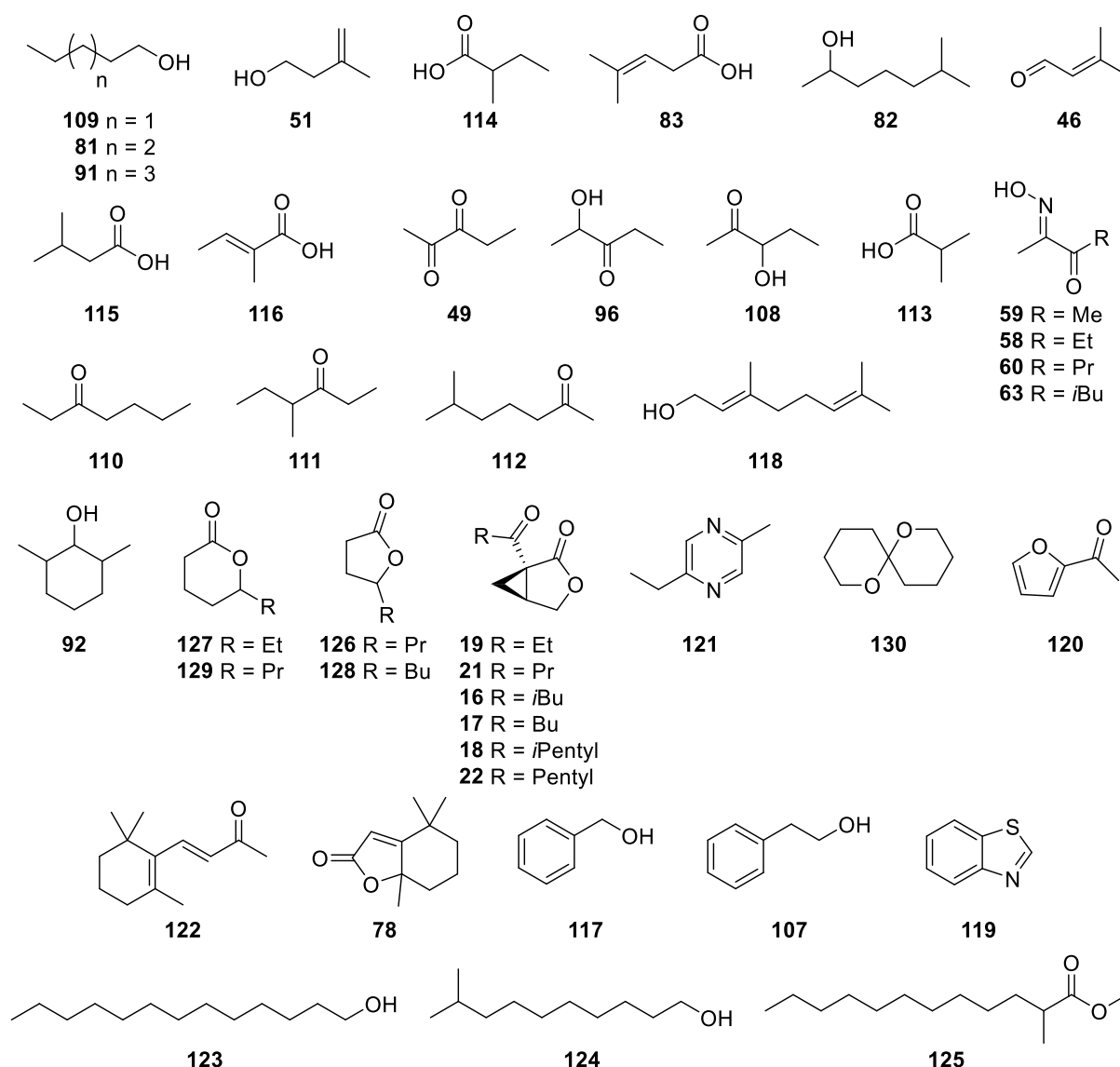

Abbildung 25: Strukturen flüchtiger Substanzen aus *S. arenicola* CNH-643.

Tabelle 2: Flüchtige Verbindungen aus den Gasphasenextrakten von *S. arenicola* CNH-643. Die Intensitäten der einzelnen Verbindungen werden mit 0-1% (o), 1-10% (x), 10-30% (xx), 30-100% (xxx) relativ zur Gesamtpeakfläche des Totalionenstromchromatogramms angegeben.

Verbindung	RI _{exp} ^a	RI _{lit} ^b	Ident. ^c	OSSA 1 (THG243)	OSSA 2 (THG244)	OSSA 3 (THG245)	CLSA (THG247)
2,3-Pentandion (49)	704	698	ms, ri	o	o	o	-
3-Methyl-3-buten-1-ol (51)	729	730	ms, ri	x	o	-	-
unbekannt 83, 55, 42	760			-	o	o	-
1-Pentanol (109)	762	765	ms, ri	x	-	o	-
3-Hydroxy-2-pentanone (108)	806		ms	o	o	o	o
2-Methylpropansäure (113)	814 ^d	774	ms	-	-	-	o
2-Hydroxy-3-pentanone (96)	816	821	ms, ri	o	o	o	x
4-Methyl-3-hexanon (111)	830	855	ms, ri	o	-	o	-
3-Methylbutansäure (115)	863 ^d	863	ms, ri	-	-	-	o
1-Hexanol (81)	869	868	ms, ri	x	x	x	-
3-Heptanon (110)	888	887	ms, ri	o	o	o	-
2-Methylbutansäure (114)	891 ^d	861	ms	-	-	-	o
Acetylfuran (120)	915	911	ms, ri	o	o	o	-
Verbindung E	921			o	o	o	-
Tiglinsäure (116)	939 ^d	928	ms	-	-	-	o

6-Methyl-2-heptanon (112)	961	956	ms, ri	o	o	o	-
(E)-3-(Hydroxyimino)butan-2-on (59)	965	961	ms, std	-	o	o	o
6-Methyl-2-heptanol (82)	971		ms	x	o	x	-
1-Heptanol (91)	976	970	ms, ri	x	x	x	o
4-Methyl-3-pentensäure (83)	988	1011	ms	-	-	-	o
2-Ethyl-5-methylpyrazin (121)	1004	1005	ms, ri	o	o	o	-
Verbindung F	1025			-	o	o	o
Benzylalkohol (117)	1036	1036	ms, ri	o	x	x	x
(E)-2-(Hydroxyimino)pentan-3-on (58)	1060	1051	ms, std	x	xx	xx	xx
unbekannt 142, 113, 71, 57, 43	1063			-	-	-	o
2,6-Dimethylcyclohexanol (92)	1110	1112	ms, ri	-	o	-	o
Phenylethylalkohol (107)	1114	1116	ms, ri	x	xx	xx	xx
1,7-Dioxaspiro[5.5]undecan (130)	1133		ms	-	-	-	o
(E)-2-(Hydroxyimino)hexan-3-on (60)	1145	1142	std	-	o	-	o
γ -Heptalacton (126)	1157	1159	ms, ri	-	o	o	x
δ -Heptalacton (127)	1189		ms	-	-	-	o
(E)-2-(Hydroxyimino)-5-methylhexan-3-on (63)	1195	1190	ms, std	o	o	o	o
Benzothiazol (119)	1226	1229	ms, ri	o	o	o	-
unbekannt 133, 104, 43	1237			-	-	-	o
unbekannter Alkohol RI = 1242	1242			o	o	-	-
verzweigtes Keton	1247			-	-	-	o
Geraniol (118)	1258	1255	ms, ri	-	-	-	o
γ -Octalacton (128)	1261	1261	ms, ri	-	-	-	o
δ -Octalacton (129)	1287	1288	ms, ri	-	-	-	o
Salinilacton D (19)	1290	1285	std	-	o	o	o
unbekannt 181, 163, 105, 91, 75	1331			o	o	-	o
unbekannt 154, 111, 99, 84, 71, 55, 43	1340			-	-	-	o
9-Methyl-1-decanol (124)	1342		ms	o	o	o	-
Salinilacton F (21)	1373	1368	ms, std	-	-	-	o
δ -Lacton	1394			-	-	-	o
unbekannt 182, 167, 149, 125, 108	1410			-	-	-	o
Salinilacton A (16)	1415	1410	ms, std	o	o	o	o
Salinilacton B (17)	1472	1468	ms, std	o	x	x	x
β -Ionon (122)	1488	1486	ms, ri	-	o	o	o
Verbindung G	1490			-	-	-	x
2-Methyldodecansäuremethylester (125)	1526		ms	-	-	-	o
Dihydroactinidiol (78)	1530	1538	ms, ri	-	-	-	o
Salinilacton C (18)	1533	1527	ms, std	-	o	o	o
Salinilacton G (22)	1577	1566	ms, std	-	-	-	o
1-Tridecanol (123)	1578	1577	ms, ri	o	o	o	o
Methylester M = 226	1588			-	-	-	o
Methylester M = 240	1686			-	-	-	o

^adie angegebenen Werte sind Durchschnittswerte aller Messungen, ^bentnommen aus NIST Chemistry WebBook oder unserer eigenen Datenbank, ^cIdentifizierung der Verbindung beruht auf Vergleich des Massenspektrums mit Datenbank Spektrum (ms), Vergleich des Retentionsindex mit Literaturwerten gemessen auf einer gleichartigen Fused-Silica-Kapillarsäule (ri) und/oder direkter Vergleich mit einer synthetischen oder kommerziell erhältlichen Referenz-Verbindung (std), ^dstarke Peakverbreiterung, RI konnte nicht genau bestimmt werden

3.2.4. *Salinispora pacifica* (CNR-114)

Bei dem Stamm CNR-114 handelt es sich um den Typenstamm von *S. pacifica*. Das Bakterium wurde erstmals aus marinen Sedimenten aus dem Pazifischen Ozean vor der Küste von Guam isoliert und besitzt eine intensiv orangene Farbe.^[85] Das Duftprofil dieses Stammes wurde bisher noch nicht untersucht. Die TICs der zwei durchgeführten Analysen sind in Abbildung 26 zu sehen.

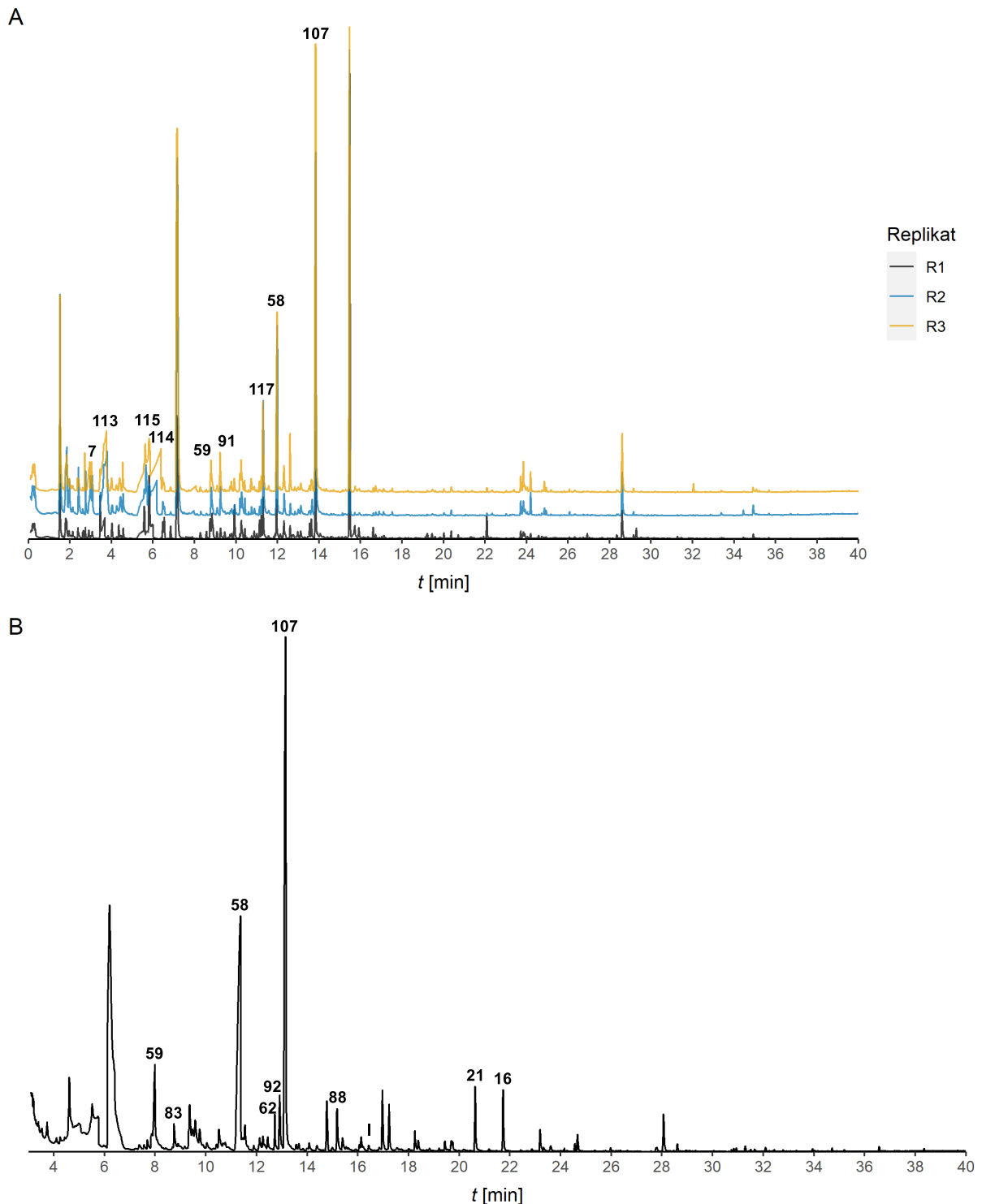
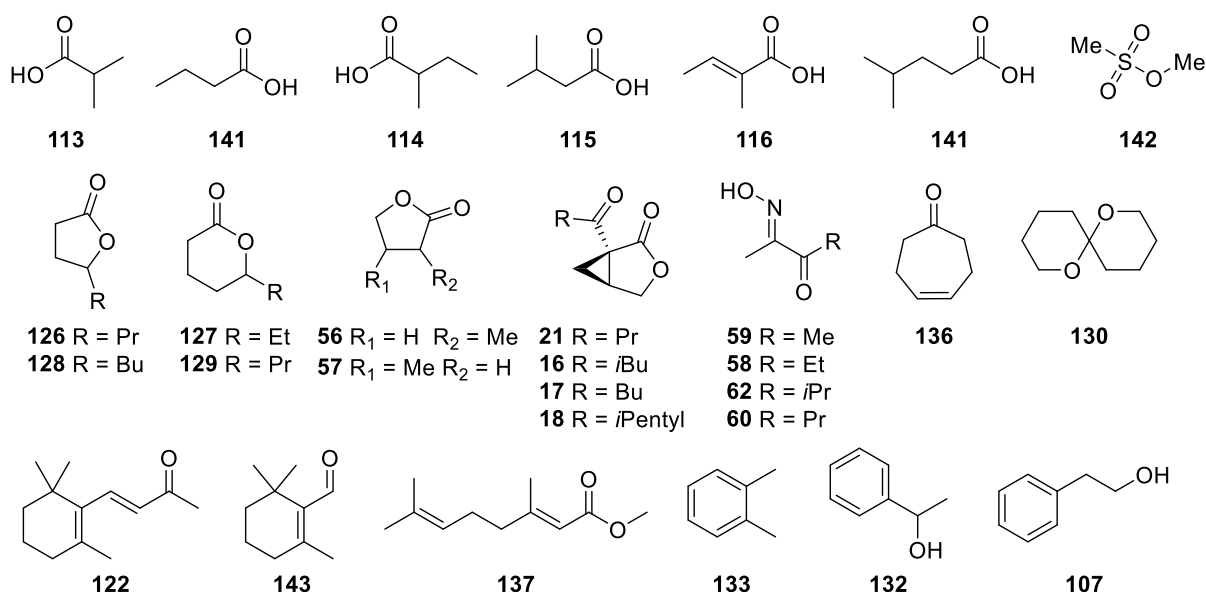


Abbildung 26: Totalionenstromchromatogramme der OSSA (A) und CLSA (B) aus *S. pacifica* CNR-114.

Die zwei Hauptkomponenten sind erneut Phenylethylalkohol (**107**) und das Oxim **58**. Bis auf **59** waren die anderen beiden Oxime **62** und **60** nur in sehr geringen Mengen vorhanden und konnten nur mittels CLSA nachgewiesen werden. Ebenso konnten die Salinilactone A-D und F (**16-19**, **21**) identifiziert werden, wobei **16** und **21** in größeren Mengen gebildet werden. Unter den sehr flüchtigen Komponenten wurden erneut viele der bereits diskutierten Verbindungen gefunden (**7**, **47**, **51**, **52**, **81**, **85**, **96**, **108**, **131**). Weitere bekannte bakterielle VOCs sind die Alkohole **80**, **91**, **92**, **117**, α -Methylbenzylalkohol (**132**), die aromatischen Kohlenwasserstoffe *o*-Xylol (**133**), Propylbenzol (**134**), 1-Ethyl-3-methylbenzol (**135**), das Keton Cyclohept-4-enon (**136**), die Ester **88**, **89** und Geraniumsäuremethylester (**137**), sowie die Pyrazine 3-Ethyl-2,5-dimethylpyrazin (**138**) und Tetramethylpyrazin (**139**).^[4,50] Dazu kommen erneut diverse γ - und δ -Lactone (**56**, **57**, **126-129** und **140**).

Auffällig ist die Produktion diverser kurzkettiger Säuren wie 2-Methylpropansäure (**113**), Butansäure (**141**), 2- und 3-Methylbutansäure (**114**, **115**), **116** und **83** (Abbildung 27). Einige der genannten Verbindungen konnten bereits vereinzelt in anderen *Salinispora*-Stämmen gefunden werden, jedoch werden die Methylester weitaus häufiger gefunden. Als einzige schwefelhaltige Verbindung kam Methansulfonsäuremethylester (**142**) im CLSA-Extrakt vor. Die Verbindung ist bereits aus Bakterien wie *S. aurantiaca*, *Loktanella* sp. und *Dinoroseobacter shibae* bekannt.^[86]

Wie schon bei CNH-643 konnten auch in diesem Stamm Abbauprodukte von Carotenoiden wie **122** und β -Cyclocitral (**143**) neben der Spiroverbindung **130** gefunden werden. Für **143** konnte eine regulierende Wirkung auf das Wurzelwachstum in Schaumkressen (*Arabidopsis*), als auch in Reis- und Tomatenpflanzen nachgewiesen werden.^[87] Zusätzlich gibt es noch diverse unbekannte Verbindungen. Interessant sind die zwei unbekannten Verbindungen **H** und **I**, deren Massenspektren in Abbildung 28 zu sehen sind. **H** wurde bereits bei der Analyse von CNB-440 in geringen Mengen gefunden.


Abbildung 27: Strukturen flüchtiger Substanzen aus *S. pacifica* CNR-114.

Die unbekannte Verbindung **I** konnte in allen Messungen von CNR-114 nachgewiesen werden, kommt allerdings nur in sehr geringen Mengen vor. Aufgrund des ungeraden Molpeaks muss es sich hierbei um eine stickstoffhaltige Verbindung handeln. Für beide Verbindungen konnten bisher keine Strukturvorschläge gemacht werden.

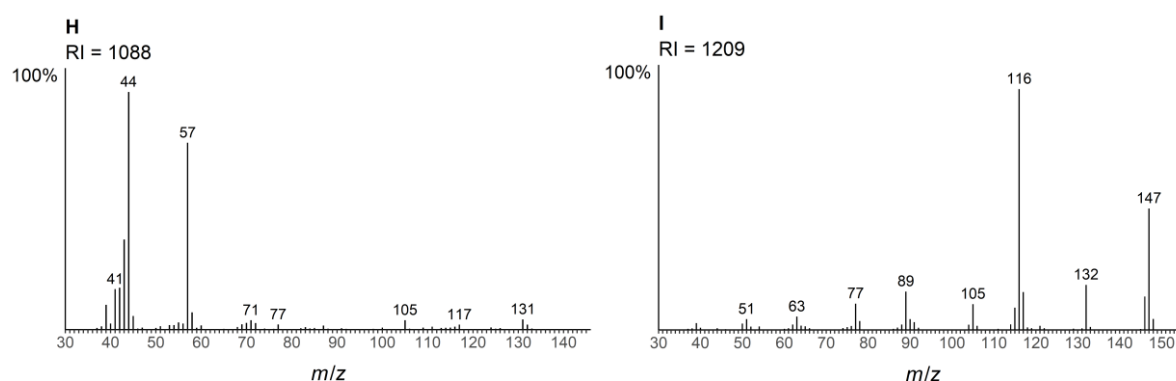

Abbildung 28: Massenspektren der unbekannten Verbindungen **H** und **I**.

Tabelle 3: Flüchtige Verbindungen aus den Gasphasenextrakten von *S. pacifica* CNR-114. Die Intensitäten der einzelnen Verbindungen werden mit 0-1% (o), 1-10% (x), 10-30% (xx), 30-100% (xxx) relativ zur Gesamtpeakfläche des Totalionenstromchromatogramms angegeben.

Verbindung	RI _{exp} ^a	RI _{lit} ^b	Ident. ^c	OSSA 1 (THG215)	OSSA 2 (THG216)	OSSA 3 (THG217)	CLSA (THG187)
1-Hydroxy-2-propanon (47)	708	665	ms	o	o	o	-
3-Methyl-3-buten-1-ol (51)	726	730	ms, ri	o	o	-	-
Acetoin (7)	733	713	ms	o	o	o	-
(<i>E</i>)-2-Methylbut-2-en-1-ol (52)	768	769	ms, ri	-	o	o	-
2-Methylpropanensäure (113)	778	774	ms	-	x	x	-
Butansäure (141)	795	805	ms, ri	-	o	o	-
3-Hydroxy-2-pentanone (108)	807		ms	-	o	o	o
Essigsäurebutylester (85)	810	812	ms, ri	o	o	o	-
2-Hydroxy-3-pentanone (96)	813	821	ms, ri	o	x	o	o
4-Hydroxy-4-methyl-2-pentanone (131)	842	838	ms, ri	-	-	-	o

unbekannt 71, 45, 43	850			-	-	-	0
3-Methylbutansäure (115)	861	863	ms, ri	-	x	x	-
1-Hexanol (81)	865	868	ms, ri	0	0	-	-
2-Methylbutansäure (114)	876	861	ms, ri	x	x	x	-
o-Xylol (133)	888	887	ms, ri	0	0	0	-
Verbindung E	918			-	-	-	0
unbekannt 98, 55, 42	926			0	0	-	-
Tiglinsäure (116)	933	928	ms, ri	0	0	0	-
2-Methylbutanolid (56)	949	948	ms, ri	-	-	0	0
Propylbenzol (134)	950	953	ms, ri	0	0	0	-
3-Methylbutanolid (57)	958		ms	-	-	-	0
1-Ethyl-3-methylbenzol (135)	958	957	ms, ri	x	0	0	-
(E)-3-(Hydroxyimino)butan-2-on (59)	959	961	ms, std	-	x	0	x
1-Heptanol (91)	970	970	ms, ri	0	x	x	-
4-Methyl-3-pentensäure (83)	982	1011	ms	-	-	-	0
Cyclohept-4-enon (136)	1003		ms	-	0	-	0
unbekannt 110, 82, 67, 54	1011			-	0	0	-
unbekannt 115, 57, 42	1018			-	0	0	0
Cymol	1022	1025	ms, ri	0	0	0	-
Benzylalkohol (117)	1032	1036	ms, ri	x	x	x	x
unbekannt 97, 69, 56	1037			-	-	0	0
γ-Hexalacton (140)	1052	1057	ms, ri	-	-	-	0
(E)-2-(Hydroxyimino)pentan-3-on (58)	1053	1051	ms, std	x	x	x	xx
α-Methylbenzylalkohol (132)	1060	1061	ms, ri	-	-	-	0
Methansulfonsäuremethylester (142)	1061	1081	ms	-	-	-	0
3-Ethyl-2,5-dimethylpyrazin (138)	1083	1082	ms, ri	-	0	0	0
Tetramethylpyrazin (139)	1086	1089	ms, ri	-	-	-	0
Verbindung H	1087			0	0	0	-
(E)-2-(Hydroxyimino)-4-methylpentan-3-on (62)	1097	1095	ms, std	-	-	-	0
2,6-Dimethylcyclohexanol (92)	1103	1112	ms, ri	-	0	0	x
unbekannt 140, 112, 69, 43, 41	1106			-	-	-	0
Phenylethylalkohol (107)	1110	1116	ms, ri	x	x	xx	xx
1,7-Dioxaspiro[5.5]undecan (130)	1127		ms	-	-	-	0
Verbindung J	1133			-	0	0	0
(E)-2-(Hydroxyimino)hexan-3-on (60)	1140	1142	ms, std	-	-	-	0
γ-Heptalacton (126)	1150	1159	ms, ri	-	-	-	0
2-Phenyl-1-propanol (80)	1169	1179	ms, ri	-	-	-	0
Phenylethylsäuremethylester (88)	1176	1178	ms, ri	-	0	0	x
δ-Heptalacton (127)	1182		ms	-	-	-	0
δ-Lacton RI = 1206	1206			-	-	-	0
Verbindung I	1209			0	0	0	0
β-Cyclocitral (143)	1217	1220	ms, ri	-	0	0	-
unbekannt 184, 110, 95, 71, 43	1232			-	0	0	-
unbekannter Alkohol RI = 1235	1235			-	-	-	x
Phenylethylsäureethylester (89)	1243	1246	ms, ri	-	-	-	0
δ-Lacton RI = 1244	1244			-	-	-	x
γ-Octalacton (128)	1255	1261	ms, ri	-	-	-	0
δ-Octalacton (129)	1280	1288	ms, ri	-	-	-	0
Salinilacton D (19)	1284	1285	ms, std	-	-	-	0
Geraniumsäuremethylester (137)	1323	1324	ms, ri	-	-	-	0
Salinilacton F (21)	1368	1368	ms, std	-	-	-	x
Salinilacton A (16)	1409	1410	ms, std	-	0	0	x
Salinilacton B (17)	1467	1468	ms, std	-	-	-	0
β-Ionon (122)	1484	1486	ms, ri	-	0	0	-
Salinilacton C (18)	1527	1527	ms, std	-	-	-	0
Dioctylether (150)	1663	1659	ms, ri	-	-	-	0
unbekannt 127, 113, 83, 71, 57	1808			-	-	-	0

^adie angegebenen Werte sind Durchschnittswerte aller Messungen, ^bentnommen aus NIST Chemistry WebBook oder unserer eigenen Datenbank, ^cIdentifizierung der Verbindung beruht auf Vergleich des Massenspektrums mit Datenbank Spektrum (ms), Vergleich des Retentionsindex mit Literaturwerten gemessen auf einer gleichartigen Fused-Silica-Kapillarsäule (ri) und/oder direkter Vergleich mit einer synthetischen oder kommerziell erhältlichen Referenz-Verbindung (std)

3.2.5. *Salinispora pacifica* (CNR-894)

Bei dem Stamm CNR-894 handelt es sich um ein marines Bakterium der Gattung *S. pacifica*. Es wurde erstmal aus Sedimenten vor der Küste von Palau isoliert.^[36] Eine Analyse der produzierten VOCs wurde vor dieser Arbeit noch nicht durchgeführt. Die Totalionenstromchromatogramme der durchgeführten Analysen sind in Abbildung 29 zu sehen. Allgemein konnten nur wenige flüchtige Verbindungen identifiziert werden. Von diesen sind die meisten schon aus den Headspace-Analysen der bereits diskutierten *Salinispora*-Stämme bekannt. Die Hauptkomponenten sind 2,5-Dimethylpyrazin (**144**), 1-Heptanol (**91**), Phenylethylalkohol (**107**), sowie das Oxim **58**. Einfache methyl- und ethylverzweigte Pyrazine wie **144** können durch autoklavieren des Mediums entstehen und sind daher häufig in den gemessenen Blindproben zu finden.^[88] Zeitgleich gehören Pyrazine aber auch zu einer großen Gruppe flüchtiger Verbindungen, die von vielen Bakterien produziert werden und in der Natur weit verbreitet sind. Sie besitzen einen intensiven Geruch und sind wichtige Aromakomponenten in fermentierten Nahrungsmitteln.^[4,89] Die Identifizierung als bakterieller Duftstoff muss daher kritisch hinterfragt werden. Das Pyrazin **144** konnte hier im Vergleich zu den Blindproben erstmals in höheren Mengen gemessen werden. Es ist daher anzunehmen, dass diese Verbindung wirklich von CNR-894 produziert wird. Als weitere Pyrazine konnten **138** und **139** nachgewiesen werden. Neben dem Oxim **58** kommen auch hier die weiteren Oxime **59** und **62**, sowie die Salinilactone **16**, **17** und **21** als Duftkomponenten im CLSA-Extrakt vor. Allerdings sind die Konzentrationen dieser Verbindungen vergleichsweise gering. Daneben wurden noch einige Hydroxyketone (**7**, **96**, **108**), Ketone (**49**, **111**, **136**), Alkohole (**50**, **51**, **81**, **90**, **92**, **124**), Lactone (**56**, **57**, **127**, **129**, **140**) und diverse aromatische Komponenten (**132-134**, **145-147**) gefunden (Abbildung 30). In geringen Mengen trat Pentansäureethylester (**148**) auf. Als schwefelhaltige Verbindungen konnten Dimethyltrisulfid (**149**) und **142** nachgewiesen werden. Ersteres kommt zwar auch in der Blindprobe des Mediums vor, wird jedoch in deutlich größeren Mengen vom Bakterium produziert.

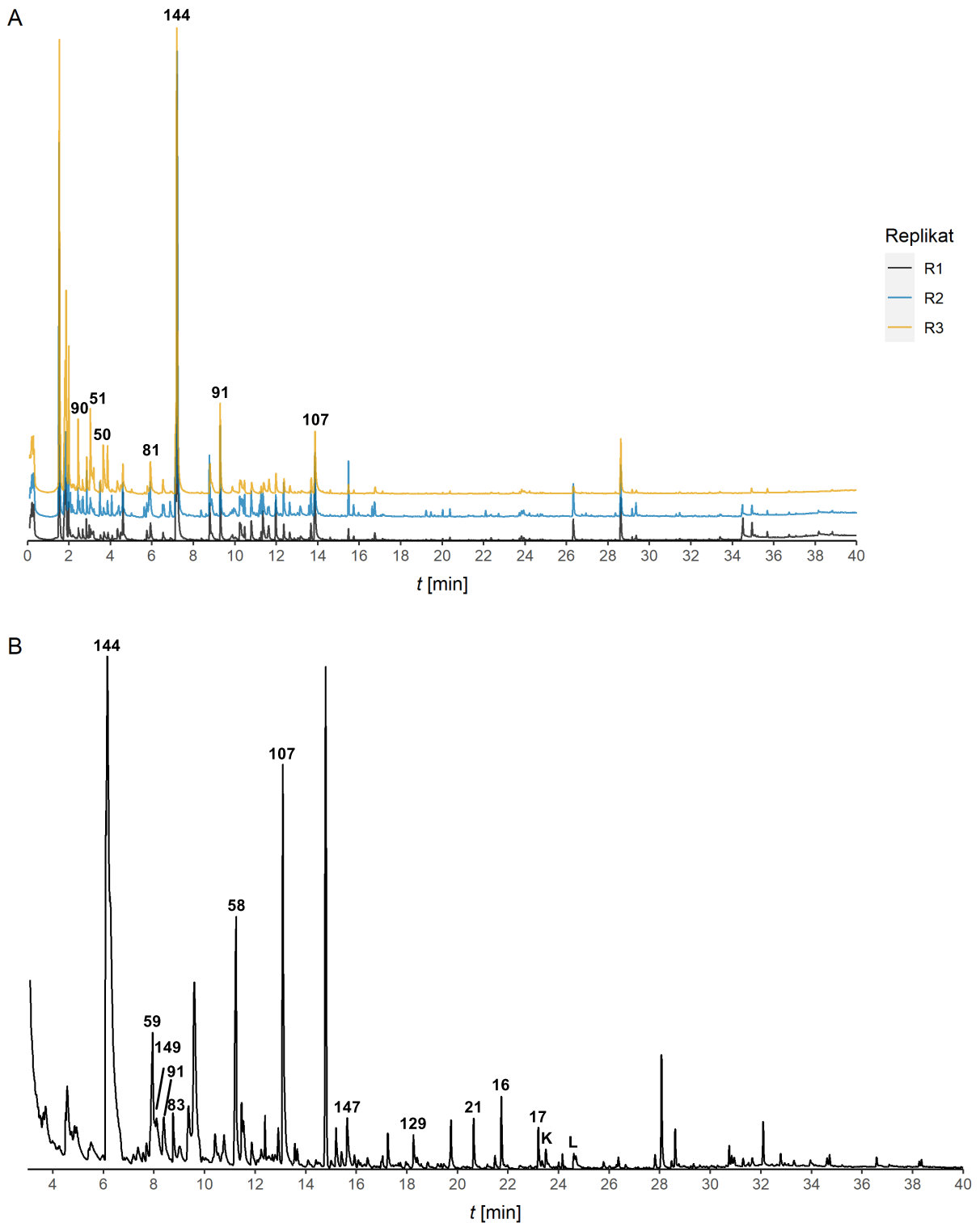


Abbildung 29: Totalionenstromchromatogramme der OSSA (A) und CLSA (B) aus *S. pacifica* CNR-894.

Wie auch schon in den meisten anderen *Salinispora*-Bakterien wurden auch hier die Norcarotenoide **143** und **122** gefunden. Zudem konnten die beiden Terpene **76** und **77**, die Spiroverbindung **130**, sowie die langkettigen Verbindungen **123**, Dioctylether (**150**) und Tridecylacetat (**151**) nachgewiesen werden. Kurzkettige Essigsäureester sind aus Bakterien bekannt und wurden bereits diskutiert. **151** ist wahrscheinlich aus

dem Alkohol **123** entstanden, als Naturstoff aber noch nicht bekannt. **150** konnte in mehreren der untersuchten *Salinispora*-Stämmen mittels CLSA nachgewiesen werden. Hauptsächlich ist diese Verbindung als Umweltverunreinigung aus Mineralöl bekannt.^[90] Es ist von daher nicht auszuschließen, dass es sich hierbei um eine Verunreinigung handelt, die durch die genutzten Pumpen bei der Extraktion eingetragen wurde.

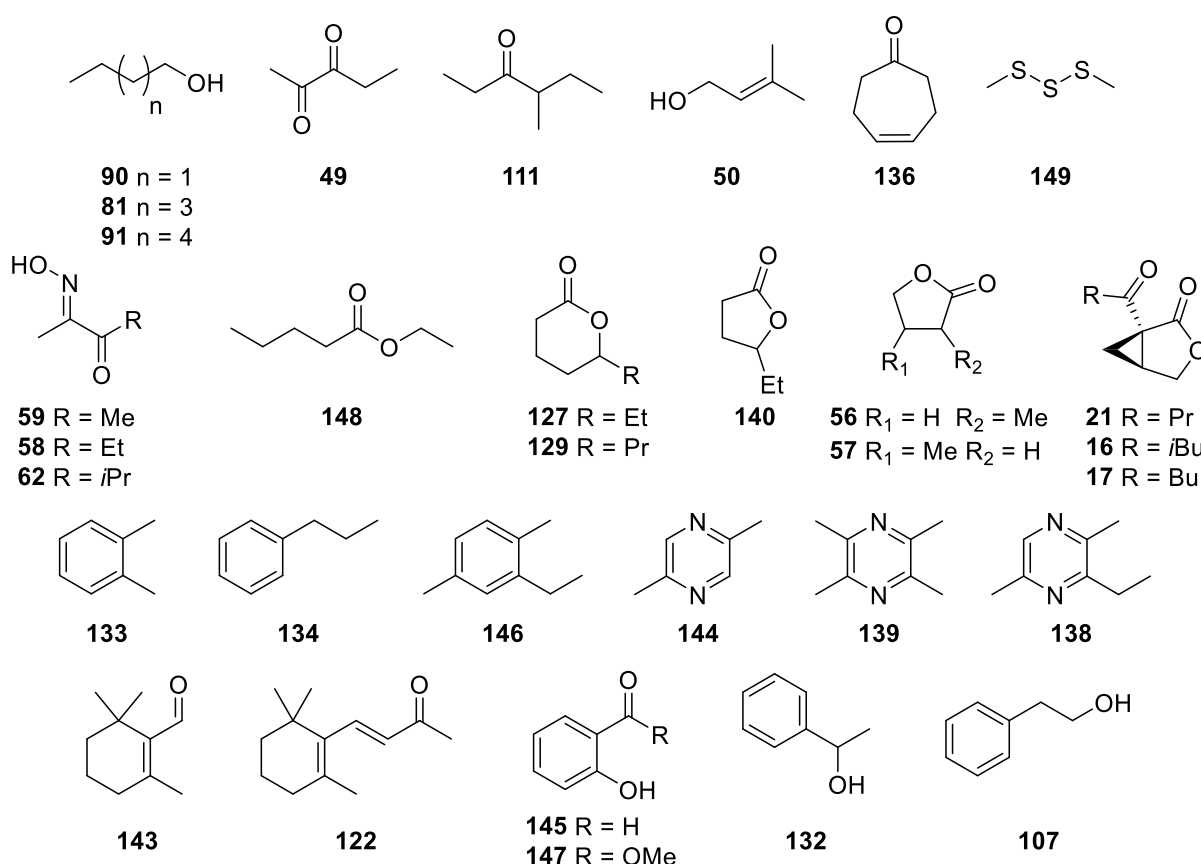


Abbildung 30: Strukturen flüchtiger Substanzen aus *S. pacifica* CNR-894.

Neben den genannten wurden auch einige unbekannte Verbindungen in geringen Konzentrationen gefunden. Erneut konnten **E** und **H** identifiziert werden. Zusätzlich wurden noch die vier unbekannte Verbindungen **J-M** gefunden. **J** und **M** wurden in den drei Replikaten der OSSA identifiziert, die Verbindungen **K** und **L** jeweils nur im CLSA-Extrakt (Abbildung 31). Die Massenspektren von **K** und **L** weisen das gleiche Fragmentierungsmuster mit den Fragment-Ionen $m/z = 125, 140$ auf. Es handelt sich wahrscheinlich um isomere Verbindungen. Die Summenformeln beider Verbindungen wurden zu $\text{C}_9\text{H}_{12}\text{O}_3$ bestimmt (HRMS gemessen 168.07914, berechnet 168.07864 für **K**). Die einzelnen Fragment-Ionen weisen auf einen trisubstituierten Aromaten hin. Damit bleiben sowohl drei Kohlenstoffe als auch Sauerstoffe für die Substituenten. Ausgehend von dem Molpeak $m/z = 168$ kommt es zu dem für Phenole bekannten

Verlust von CO.^[51] Das Ion $m/z = 125$ kann im Anschluss durch den Verlust einer Methylgruppe gebildet werden. Eine Datenbanksuche schlägt 3-Ethoxy-4-methoxyphenol (**152**) als besten Strukturvorschlag vor.^[26] Eine Verifizierung des Strukturvorschlags durch einen synthetischen Standard steht noch aus. Die ähnliche Verbindung **102** konnte bereits in *S. tropica* CNB-440 nachgewiesen werden.

Das Massenspektrum der Verbindung **M** zeigt große Übereinstimmung mit dem Datenbankeintrag von 2-Methylcyclopentanon (**153**).^[26] Eine Verifizierung durch den Vergleich mit einer Referenzprobe steht noch aus. **153** ist als natürliche Verbindung aus *Finegoldia magna* UCD-MLG bekannt, einem Magen-Darm-Bakterium, welches in Menschen, aber auch Hunden und Katzen identifiziert wurde.^[91] Für die unbekannte Verbindung **J** konnte bisher kein Strukturvorschlag gemacht werden.

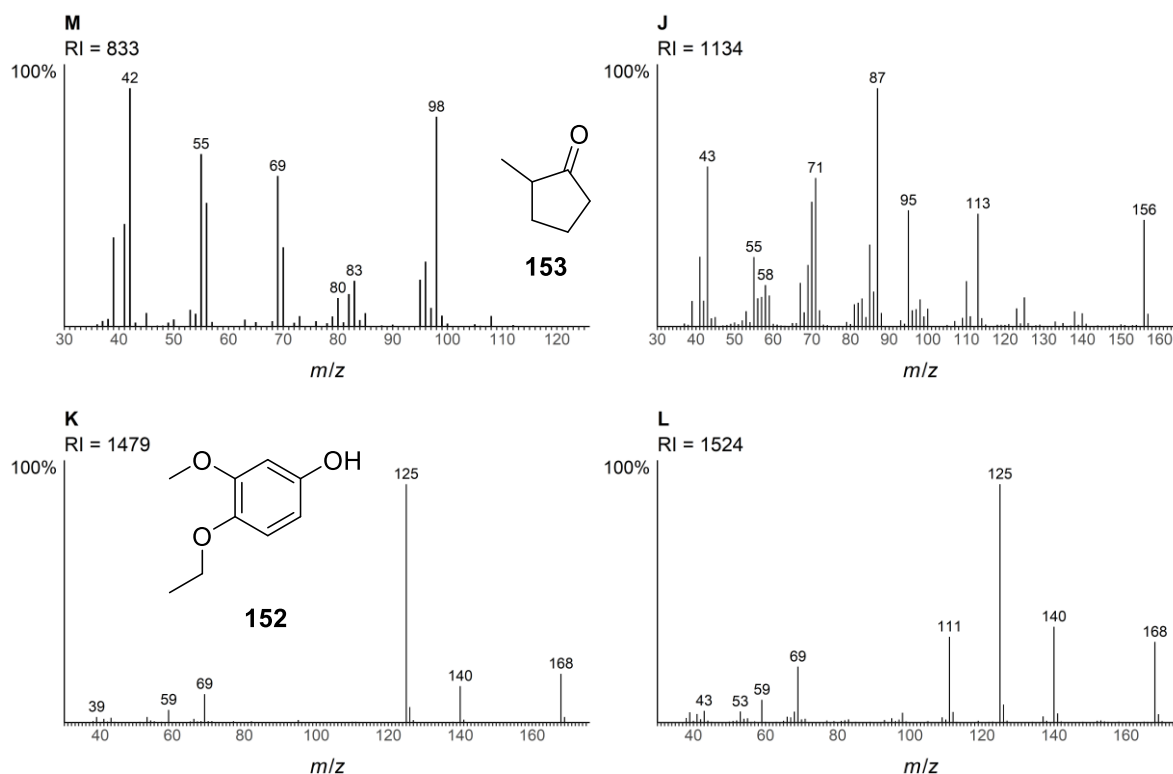


Abbildung 31: Massenspektren der unbekannten Verbindungen **J - M**, sowie die durch Datenbankabgleich gemachten Strukturvorschläge **152** und **153**.

Tabelle 4: Flüchtige Verbindungen aus den Gasphasenextrakten von *S. fenicalii* CNR-942. Die Intensitäten der einzelnen Verbindungen werden mit 0-1% (o), 1-10% (x), 10-30% (xx), 30-100% (xxx) relativ zur Gesamtpeakfläche des Totalionenstromchromatogramms angegeben.

Verbindung	RI _{exp} ^a	RI _{lit} ^b	Ident. ^c	OSSA 1 (THG209)	OSSA 2 (THG2010)	OSSA 3 (THG211)	CLSA (THG188)
1-Butanol (90)	670	659	ms, ri	o	x	x	-
2,3-Pentandion (49)	702	698	ms, ri	o	-	o	-
3-Methyl-3-buten-1-ol (51)	728	730	ms, ri	o	o	x	-
Acetoin (7)	739	713	ms	o	o	x	-
Prenol (50)	771	775	ms, ri	o	-	x	-
3-Hydroxy-2-pentanone (108)	808		ms	o	-	o	o

2-Hydroxy-3-pentanon (96)	815	821	ms, ri	o	o	o	-
4-Methyl-3-hexanon (111)	829	855	ms, ri	-	-	-	-
Verbindung M	833			o	o	o	-
1-Hexanol (81)	866	868	ms, ri	x	x	x	-
o-Xylol (133)	890	887	ms, ri	o	o	-	o
Pentansäureethylester (148)	907	900	ms, ri	-	-	-	o
2,5-Dimethylpyrazin (144)	910	917	ms, ri	xx	xx	xx	xxx
Verbindung E	916			-	-	-	x
α -Pinen (76)	930	937	ms, ri	-	-	-	o
2-Methylbutanolid (56)	950	948	ms, ri	-	-	-	o
Propylbenzol (134)	951	953	ms, ri	o	o	-	-
3-Methylbutanolid (57)	959		ms	-	-	-	o
(E)-3-(Hydroxyimino)butan-2-on (59)	961	961	ms, std	-	-	-	x
Dimethyltrisulfid (149)	965	970	ms, ri	-	-	-	x
1-Heptanol (91)	972	970	ms, ri	x	x	x	x
4-Methyl-3-pentensäure (83)	982	1011	ms	-	-	-	x
Cyclohept-4-enon (136)	1003		ms	-	-	-	o
Salicylaldehyd (145)	1040	1047	ms, ri	o	o	-	-
(E)-2-(Hydroxyimino)pentan-3-on (58)	1053	1051	ms, std	x	-	-	x
γ -Hexalacton (140)	1053	1057	ms, ri	-	-	-	o
α -Methylbenzylalkohol (132)	1060	1061	ms, ri	-	-	-	o
Methansulphonsäuremethylester (142)	1060	1081	ms	-	-	-	x
2-Ethyl-1,4-dimethylbenzol (146)	1075	1074	ms, ri	-	-	-	o
3-Ethyl-2,5-dimethylpyrazin (138)	1084	1082	ms, ri	o	o	o	-
Tetramethylpyrazin (139)	1086	1089	ms, ri	-	-	-	o
Verbindung H	1088			o	o	-	-
(E)-2-(Hydroxyimino)-4-methylpentan-3-on (62)	1096	1095	ms, std	-	-	-	o
2,6-Dimethylcyclohexanol (92)	1103	1112	ms, ri	-	-	o	o
Phenylethylalkohol (107)	1110	1116	ms, ri	x	x	x	x
1,7-Dioxaspiro[5.5]undecan (130)	1128		ms	-	-	-	o
Verbindung J	1134			o	o	o	-
Menthol (77)	1171	1174	ms, ri	o	o	o	o
δ -Heptalacton (127)	1183		ms	-	-	-	o
Salicylsäuremethylester (147)	1193	1192	ms, ri	o	o	-	x
δ -Lacton RI = 1207	1207			-	-	-	o
β -Cyclocitral (143)	1218	1220	ms, ri	o	o	o	-
unbekannter Alkohol RI = 1235	1236			-	-	-	o
δ -Lacton RI = 1244	1245			-	-	-	o
δ -Octalacton (129)	1280	1288	ms, ri	-	-	-	o
9-Methyl-1-decanol (124)	1336		ms	-	-	-	o
Salinilacton F (21)	1367	1368	ms, std	-	-	-	o
Salinilacton A (16)	1410	1410	ms, std	o	o	o	o
Salinilacton B (17)	1469	1468	ms, std	o	-	o	o
Verbindung K	1479			-	-	-	o
β -Ionon (122)	1484	1486	ms, ri	o	o	o	-
Verbindung L	1524			-	-	-	o
1-Tridecanol (123)	1574	1577	ms, ri	o	o	-	-
Diocylether (150)	1663	1659	ms, ri	-	-	-	o
Tridecylacetat (151)	1709	1711	ms, ri	o	o	o	-

^adie angegebenen Werte sind Durchschnittswerte aller Messungen, ^bentnommen aus NIST Chemistry WebBook oder unserer eigenen Datenbank, ^cIdentifizierung der Verbindung beruht auf Vergleich des Massenspektrums mit Datenbank Spektrum (ms), Vergleich des Retentionsindex mit Literaturwerten gemessen auf einer gleichartigen Fused-Silica-Kapillarsäule (ri) und/oder direkter Vergleich mit einer synthetischen oder kommerziell erhältlichen Referenz-Verbindung (std)

3.2.6. *Salinispora fenicalii* (CNR-942)

S. fenicalii CNR-942 wurde erstmals im Jahr 2004 aus marinen Sedimenten vor der Küste von Palau isoliert und besitzt eine orangene Farbe. Benannt wurde es zusammen mit dem Typenstamm CNT^T-569 nach William Fenical für seinen Beitrag zur Erforschung mariner Naturstoffe aus *Salinispora*-Bakterien.^[37]

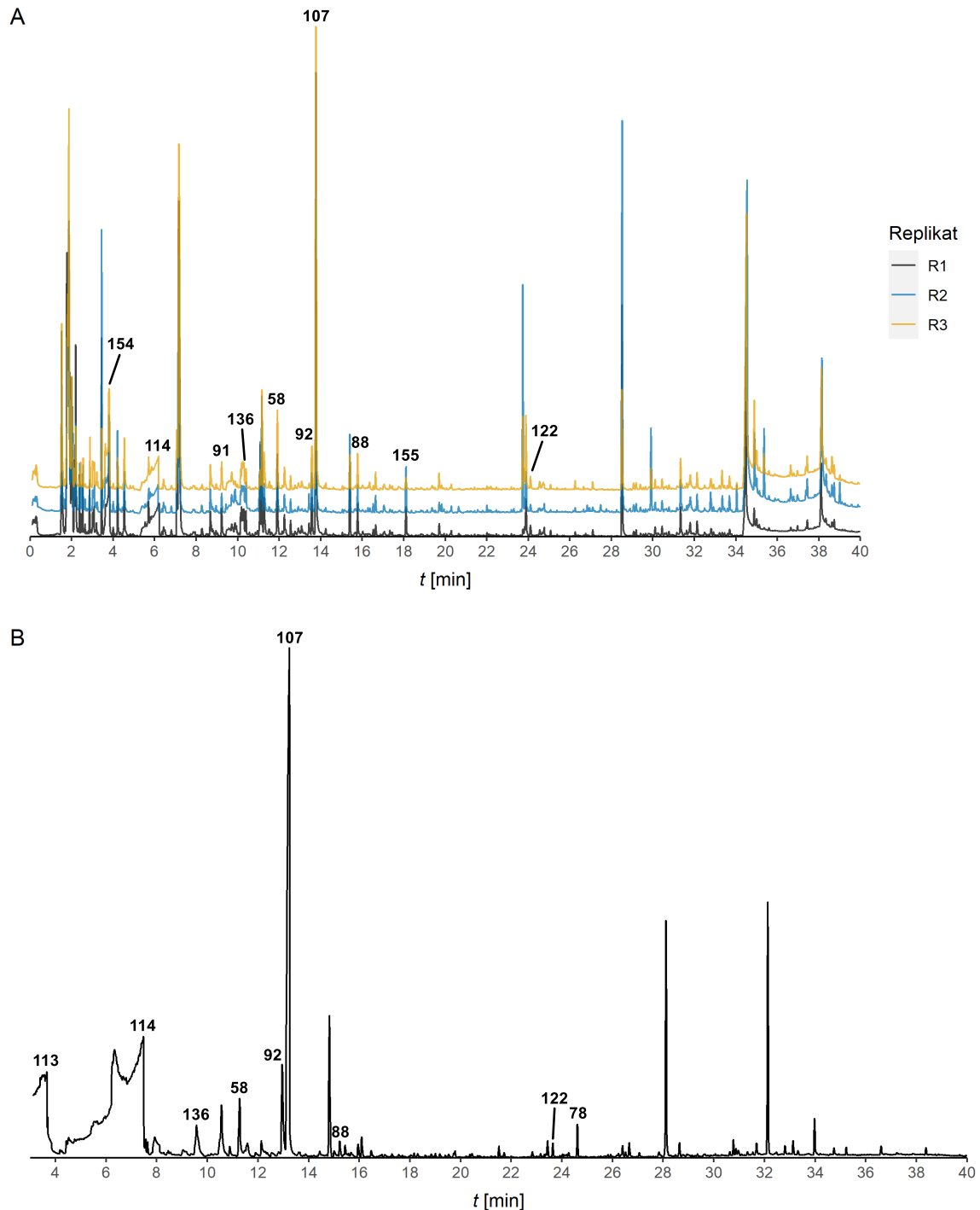


Abbildung 32: Totalionenstromchromatogramme der OSSA (A) und CLSA (B) aus *S. fenicalii* CNR-942.

Hauptbestandteil des Duftprofils ist Phenylethylalkohol (**107**). Zusätzlich werden Cyclopentanon (**154**), das Oxim **58** und die Säuren **113** und **114** in größeren Mengen von dem Bakterium emittiert (Abbildung 32). **154** ist bereits aus vielen Actinobakterien bekannt.^[4] Weitere Oxime neben **58** wurden nicht gefunden. Ebenso werden von diesem Stamm aufgrund des Fehlens des *spt* Genclusters keine Salinilactone produziert.^[43] Stattdessen wurden die beiden Essigsäureester Linalylacetat (**155**) und α -Terpinylacetat (**156**) und unbekannte Diterpene in den Replikaten der OSSA gefunden. α -Terpineol und Linalool sind aus Actinobakterien und *S. aurantiaca* bekannt.^[4,92] **155** kommt in Lavendelöl vor.^[93] Bei den beiden Verbindungen **155** und **156** könnte es sich um Artefakte handeln, die durch nicht-enzymatische Reaktionen der entsprechenden Alkohole mit Essigsäure entstanden sind.

Die Massenspektren der Diterpene weisen alle die Ionen $m/z = 229$, 272 auf (Abbildung 33). Eine nähere Charakterisierung dieser Verbindungen ist nicht erfolgt.

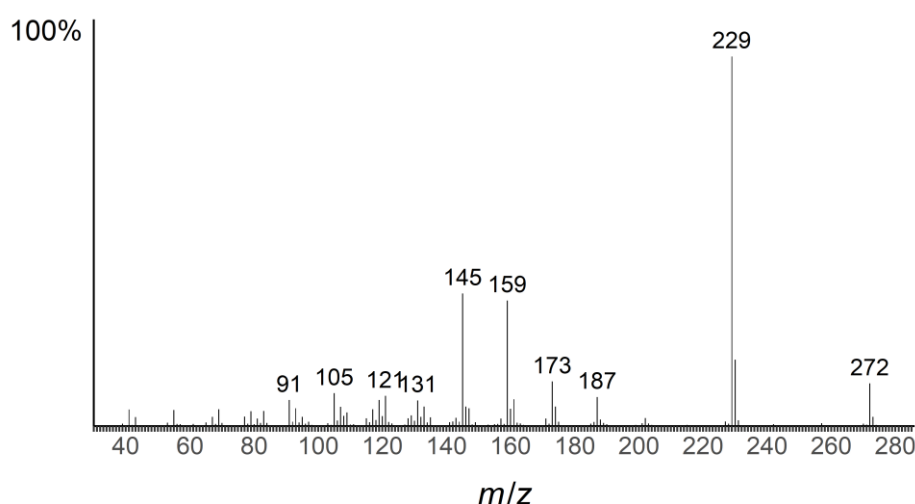


Abbildung 33: Massenspektrum eines der gefundenen Diterpene in *S. fenicalii* CNR-942.

Neben diversen bereits diskutierten flüchtigen Verbindungen wie einigen Alkoholen, Ketonen und Säuren (Abbildung 34), wurden nur wenige neue Verbindungen identifiziert. Eine davon ist 6-Methyl-5-hepten-2-ol (**157**). Die Verbindung ist bereits aus Cyanobakterien bekannt und stammt aus dem enzymatischen Abbau von Carotenoiden durch Oxygenasen.^[4,94] Des Weiteren konnten einige aromatische Verbindungen wie Cymol, 1-Phenyl-2-propanon (**158**), *p*-Methylacetophenon (**159**), 2-Cumaranon (**160**), Trimethylbenzaldehyd (**161**) und Trimethylbenzylalkohol (**162**) gefunden werden, die allerdings nur in sehr geringen Konzentrationen vorkommen. **158** ist eine bekannte Verbindung aus *Saccharopolyspora erythraea* und

Streptomyces filamentosus.^[50] Obwohl Trimethylbenzol als Naturstoff beschrieben wurde^[69], sind die möglichen Oxidationsprodukte **161** und **162** bisher nicht aus Bakterien bekannt. Über Cymol und **160** wurde als Verbindungen, allerdings noch nicht als bakterielle Naturstoffe, berichtet. **160** konnte bereits in marinen Sedimenten nachgewiesen werden.^[95] Eine weitere bisher unbekannte Verbindung ist 1-Chlordecan (**163**). Die Verbindung kommt in erhöhten Konzentrationen nur in den Replikaten der OSSA vor. Chlorierte Verbindungen kommen zwar natürlich vor, sind aber dennoch selten zu finden, sodass es sich bei dieser Verbindung sehr wahrscheinlich um eine Probenverunreinigung handelt.^[96] Die C₁₀-C₁₃ Chlorparaffine sind zudem häufig verwendete Weichmacher^[97] und können daher von den verwendeten Kunststoff-Petrischalen stammen. Gleiches gilt auch für diverse Lösungsmittelsignale, die bei jeder Messung am Anfang der mittels thermischen Desorption erhaltenen TICs zu finden sind.

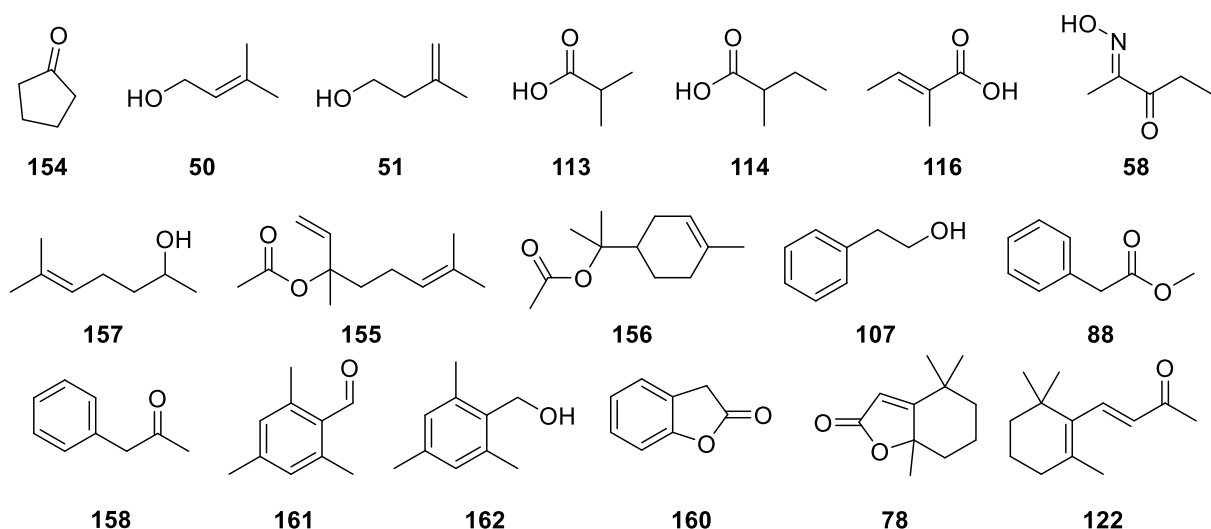


Abbildung 34: Strukturen flüchtiger Substanzen aus *S. fenicalii* CNR-942.

Tabelle 5: Flüchtige Verbindungen aus den Gasphasenextrakten von *S. fenicalii* CNR-942. Die Intensitäten der einzelnen Verbindungen werden mit 0-1% (o), 1-10% (x), 10-30% (xx), 30-100% (xxx) relativ zur Gesamtpeakfläche des Totalionenstromchromatogramms angegeben.

Verbindung	RI _{exp} ^a	RI _{lit} ^b	Ident. ^c	OSSA 1 (THG228)	OSSA 2 (THG229)	OSSA 3 (THG230)	CLSA (THG185)
Cyclohexan	659	667	ms, ri	o	o	o	-
3-Methyl-3-buten-1-ol (51)	727	730	ms, ri	o	o	o	-
Propansäure	731	700	ms	o	o	o	-
Acetoin (7)	740	713	ms	o	o	o	-
Prenol (50)	769	755	ms, ri	o	o	o	-
Cyclopentanone (154)	783	791	ms, ri	x	x	x	-
2-Methylpropansäure (113)	784 ^d	774	ms	o	o	o	x
Essigsäurebutylester (85)	810	812	ms, ri	o	o	-	-
4-Hydroxy-4-methyl-2-pentanon (131)	845	838	ms, ri	o	o	o	o
1-Hexanol (81)	865	868	ms, ri	o	o	o	-

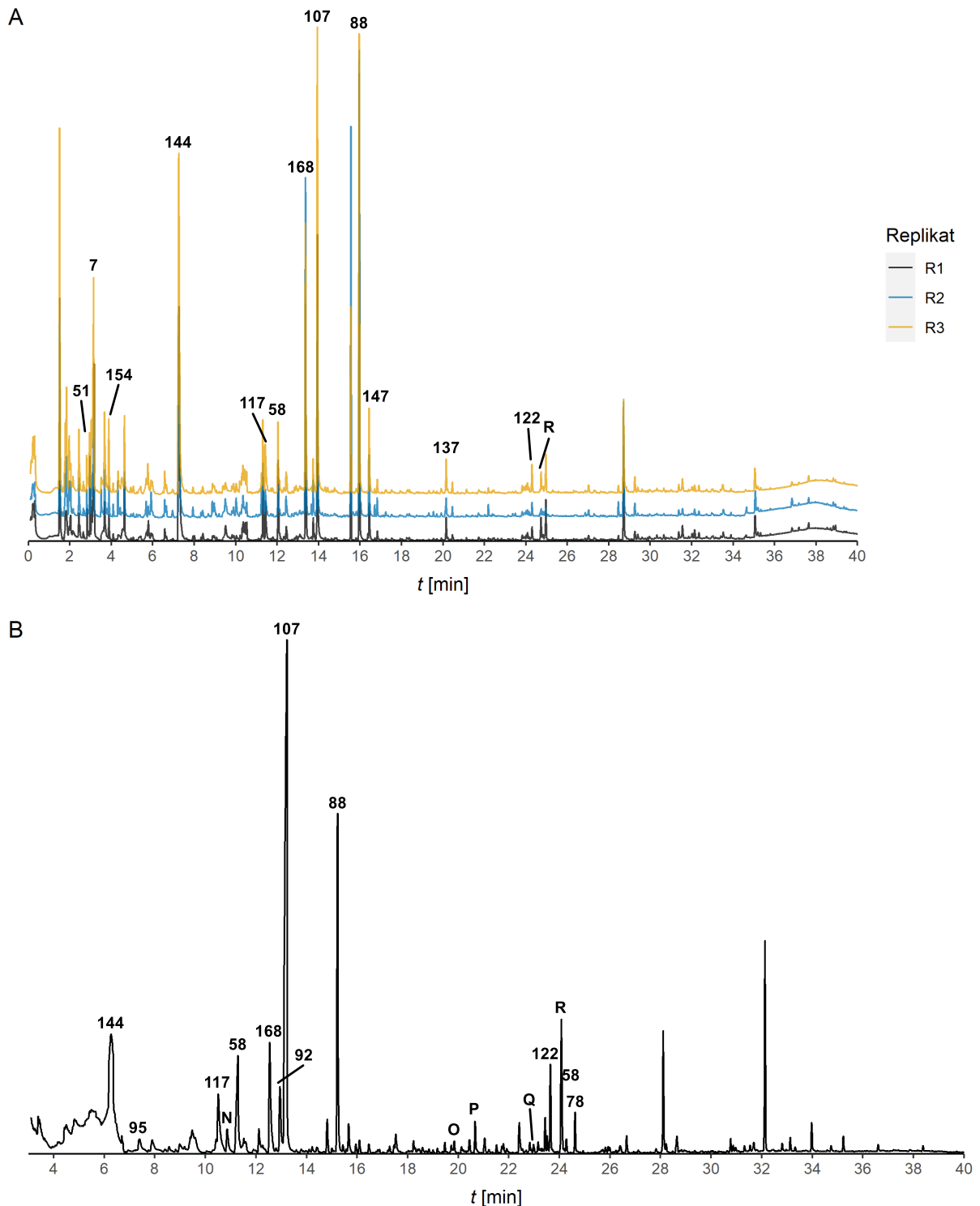
Duftprofilanalyse verschiedener *Salinispora*-Spezies

2-Methylbutansäure (114)	877 ^d	861	ms	x	x	x	x
3-Heptanon (110)	883	887	ms, ri	o	o	o	-
o-Xylol (133)	889	887	ms, ri	o	o	o	o
Tiglinsäure (116)	933	928	ms, ri	o	o	o	o
1-Ethyl-3-methylbenzol (135)	958	957	ms, ri	o	o	-	-
1-Heptanol (91)	971	970	ms, ri	o	o	o	-
2-Methyl-2-butenol	979		ms	o	-	o	-
6-Methyl-5-hepten-2-ol (157)	993	986	ms, ri	o	o	o	-
Cyclohept-4-enon (136)	1003		ms	o	o	o	-
unbekannt 108, 79, 66	1020			o	-	o	-
Cymol	1022	1025	ms, ri	o	o	-	o
verzweigtes Alkan RI = 1034	1034			o	o	o	-
(E)-2-(Hydroxyimino)pentan-3-on (58)	1053	1051	ms, std	x	o	x	x
α-Methylbenzylalkohol (132)	1060	1061	ms, ri	o	-	o	o
verzweigtes Alkan RI = 1064	1064			o	o	o	-
2,6-Diethylpyrazin	1083	1084	ms, ri	o	-	o	-
unbekannt 71, 57, 44	1088			o	-	o	-
2,6-Dimethylcyclohexanol (92)	1103	1112	ms, ri	o	o	o	x
Phenylethylalkohol (107)	1110	1112	ms, ri	x	x	x	x
1-Phenyl-2-propanon (158)	1126	1116	ms, ri	o	o	o	o
Phenyllessigsäuremethylester (88)	1176	1124	ms, ri	o	o	o	o
p-Methylacetophenon (159)	1183	1178	ms, ri	-	-	o	o
δ-Heptalacton (127)	1183		ms	o	o	-	o
2-Cumaranon (160)	1228		ms	o	-	o	-
unbekannt 184, 110, 95, 71, 43	1232			o	-	-	o
unbekannt 136, 105, 77, 51	1236			-	-	-	o
verzweigtes δ-Lacton RI = 1244	1247			-	-	-	o
Linalylacetat (155)	1256	1257	ms, ri	o	o	o	-
δ-Octalacton (129)	1282	1288	ms, ri	o	-	o	o
Trimethylbenzaldehyd (161)	1313		ms	o	o	o	o
unbekannt 181, 163, 105, 91, 75	1327			o	-	-	o
α-Terpinylacetat (156)	1348	1350	ms, ri	o	o	-	-
unbekannt 150, 132, 107, 92, 81, 43	1357			-	-	-	o
Trimethylbenzylalkohol (162)	1361		ms	-	-	-	o
1-Chlordodecan (163)	1469	1470	ms, ri	o	x	o	-
Methylester RI = 1476	1476			o	o	o	o
β-Ionon (122)	1484	1486	ms, ri	-	-	-	o
unbekannt M212	1503			o	-	o	-
Dihydroactinidiol (78)	1525	1538	ms, ri	-	-	-	o
Terpenoid RI = 1611	1611			o	o	o	o
Diterpen 272, 229, 136	1706			o	o	o	-
unbekannt 168, 140, 125, 111, 97, 83, 71, 57, 43	1740			-	o	o	-
Diterpen 272, 257, 229	1765			o	o	o	-
Diterpen 272, 229, 134, 119, 93, 81	1781			o	o	o	-
unbekannt M192	1793			-	-	-	o
Diterpen 272, 229, 159, 145	1808			o	o	o	-
Diterpen 272, 229, 173, 159, 145	1830			o	o	o	-
unbekannt 242, 132, 119, 95	1847			o	o	o	-
Diterpen 272, 229, 204, 119	1880			-	o	o	-
unbekannt 227, 196, 168	1944			-	o	o	-

^adie angegebenen Werte sind Durchschnittswerte aller Messungen, ^bentnommen aus NIST Chemistry WebBook oder unserer eigenen Datenbank, ^cIdentifizierung der Verbindung beruht auf Vergleich des Massenspektrums mit Datenbank Spektrum (ms), Vergleich des Retentionsindex mit Literaturwerten gemessen auf einer gleichartigen Fused-Silica-Kapillarsäule (ri) und/oder direkter Vergleich mit einer synthetischen oder kommerziell erhältlichen Referenz-Verbindung (std), ^dstarke Peakverbreiterung, RI konnte nicht exakt bestimmt werden

3.2.7. *Salinispora cortesiana* (CNY-202)

Bei dem Stamm CNY-202 handelt es sich um den Typenstamm der neuen Spezies *S. cortesiana*. Es wurde nach seinem Fundort, dem Golf von Kalifornien (*Sea of C rt ez*, Mexico), benannt.^[37] Das Bakterium besitzt eine schwach orangene Farbe und wurde erstmals 2008 aus marinen Sedimenten aus einer Tiefe von 330 m isoliert.^[37] Die aufgenommenen TICs sind in Abbildung 35 zu sehen.



Der untersuchte *Salinispora*-Stamm produziert eine große Anzahl flüchtiger Verbindungen. Insgesamt konnten 92 VOCs nachgewiesen werden. Viele der gefundenen Verbindungen wie **53**, **86-87**, 2-Furansäuremethylester (**164**), **137**, **157** und **98**, sowie **55**, **88**, **89**, **118**, **139** und **147** sind bereits aus CNB-440, CNS-205 oder CNR-942 bekannt. Weiterhin wurde das Terpenoid Geranylaceton (**165**) im Duftprofil gefunden. Es ist als Naturstoff bekannt und konnte schon in dem marinen Actinomyceten *Streptomyces caviscabies* nachgewiesen werden.^[98] Erstmals konnten hingegen γ -Nonalacton (**166**) und γ -Decalacton (**167**) neben ihren kürzerkettigen Vertretern identifiziert werden.

Die Hauptbestandteile des Duftprofils bestehen aus dem Pyrazin **144**, den beiden Alkoholen **117** und **107**, den Estern **88** und Benzoesäuremethylester (**168**), sowie dem Oxim **58**. In geringen Mengen treten das Oxim **60**, sowie die beiden Salinilactone **16** und **17** auf (Abbildung 36). In den Replikaten der OSSA kommen zudem erneut einige der unbekannten Diterpene vor, die auch aus *S. fenicalii* CNR-942 bekannt sind. Weiterhin konnten noch einige verzweigte Methylester und andere unbekannte Substanzen in geringeren Mengen entdeckt werden. Von besonderem Interesse waren die fünf unbekannten Verbindungen **N-R**, die bis auf letztere nur im Extrakt der CLSA vorhanden waren. Die Massenspektren der Verbindungen sind in Abbildung 37 zu sehen. Eine Datenbanksuche ergab für **N** die beiden Vorschläge 4-Hydroxycyclohexanon und 3-Hexensäure. Da der Literaturwert^[26] des Retentionsindex von 3-Hexensäure (RI = 1021) doch deutlich vom gemessenen Wert von **N** (RI = 1042) abweicht, wird dieser Vorschlag verworfen. Für 4-Hydroxycyclohexanon liegt kein Literaturwert vor. Die Spektren besitzen allerdings eine gute Übereinstimmung. Für eine abschließende Zuordnung steht der Vergleich mit einem synthetischen Standard noch aus. Diverse, nichtzyklische α -Hydroxyketone sind aus Bakterien bekannt.^[4,50]

Die beiden Verbindungen **O** und **P** wiesen ein ähnliches Massenspektrum auf. Die Summenformel für **O** wurde zu C₁₁H₁₈O (HRMS gemessen 166.13534, berechnet 166.13576) bzw. für **P** zu C₁₁H₁₆O (HRMS gemessen 164.11957, berechnet 164.12011) bestimmt. Letztere besitzt somit eine weitere Unsättigung. In beiden Massenspektren konnten die Ionen $m/z = 57$, 109, 137 bzw. $m/z = 57$, 107, 135 den Fragmenten eines Ethylketons zugeordnet werden. Weiterhin passen die restlichen Fragment-Ionen auf einen Sechsring mit mindestens einer weiteren Unsättigung. Ein erster Strukturvorschlag für **O** von 1-(Cyclohex-2-en-1-yl)pentan-3-on konnte synthetisch nicht bestätigt werden. Das Fragment $m/z = 67$ könnte durch eine Retro-

Diels-Alder (RDA) Spaltung entstanden sein.^[51] Zusätzlich müsste dann von einer Methylseitenkette am Ring ausgegangen werden, was durch einen kleinen Peak $m/z = 151$ unterstützt wird. Damit würde sich als neuer Strukturvorschlag 1-(4-Methylcyclohex-2-en-1-yl)butan-2-on (**169**) für die unbekannte Verbindung **O** ergeben. Aufgrund des Massenspektrums muss **P** eine weitere Doppelbindung im Ring besitzen. Die für ein aromatisches System charakteristischen Fragmente bei $m/z = 79$ und 91 können durch den Verlust von Wasserstoff erklärt werden.

Die unbekannte Verbindung **Q** konnte nur in geringen Mengen im Gasphasenextrakt identifiziert werden, sodass keine weiteren analytischen Daten gesammelt werden konnten. Ein Datenbankabgleich des Massenspektrums schlägt verschiedene Benzoessäuremethylester-Derivate ähnlich zur Verbindung **102** aus CNB-440 vor. Die Verbindung **R** enthielt aufgrund ihres ungeraden Molekül-Ions $m/z = 161$ Stickstoff und kam bereits in den OSSA-Replikaten von CNR-942 vor. Da **R** auch als Komponente im CLSA-Extrakt gemessen wurde, konnte mittels HRMS die Summenformel zu $C_{11}H_{15}N$ (gemessen 161.12023, berechnet 161.1204) bestimmt werden. Die Ionen $m/z = 91$, 181 sind charakteristisch für aromatische Iminine.^[44] Allerdings kann das intensive Ion $m/z = 105$, welches durch die formale Abspaltung von C_4H_8 entsteht, nicht mit Hilfe eines Imins erklärt werden. Auch der Retentionsindex von $RI = 1503$ liegt ungewöhnlich hoch verglichen mit dem aus *S. pacifica* CNS-863 bekannten (*E*)-*N*-Isobutyl-1-phenylmethanimin (**26**, $RI = 1263$) (Abbildung 37). Bei der Verbindung **R** handelt es sich daher wohl nicht um ein Imin. Die Strukturaufklärung steht somit weiterhin aus.

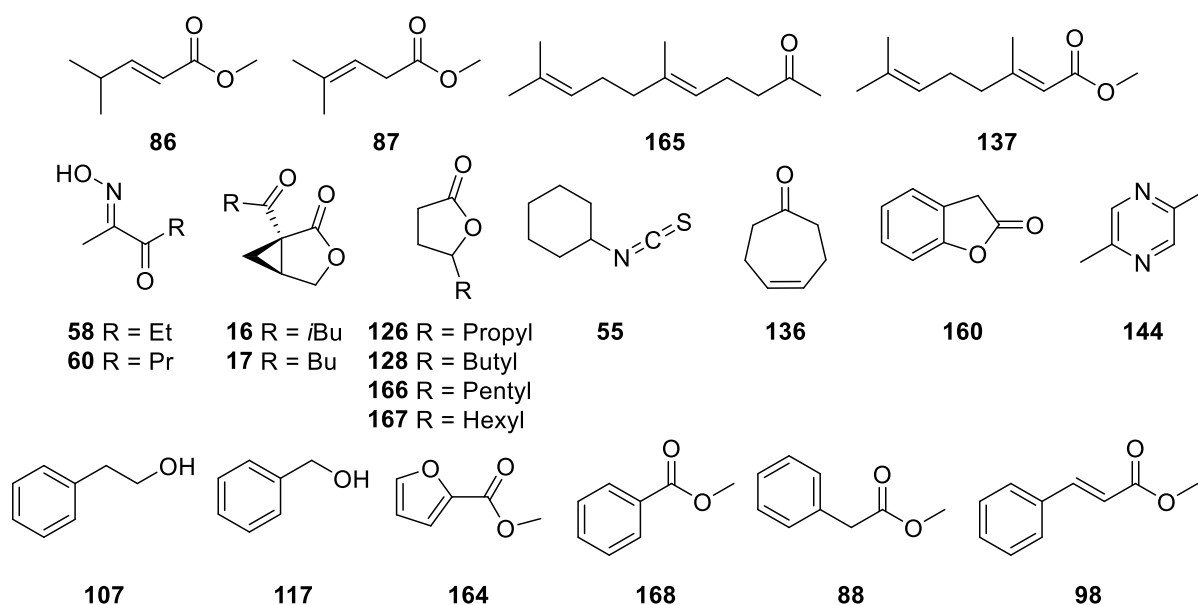


Abbildung 36: Strukturen flüchtiger Substanzen aus *S. cortesiana* CNY-202.

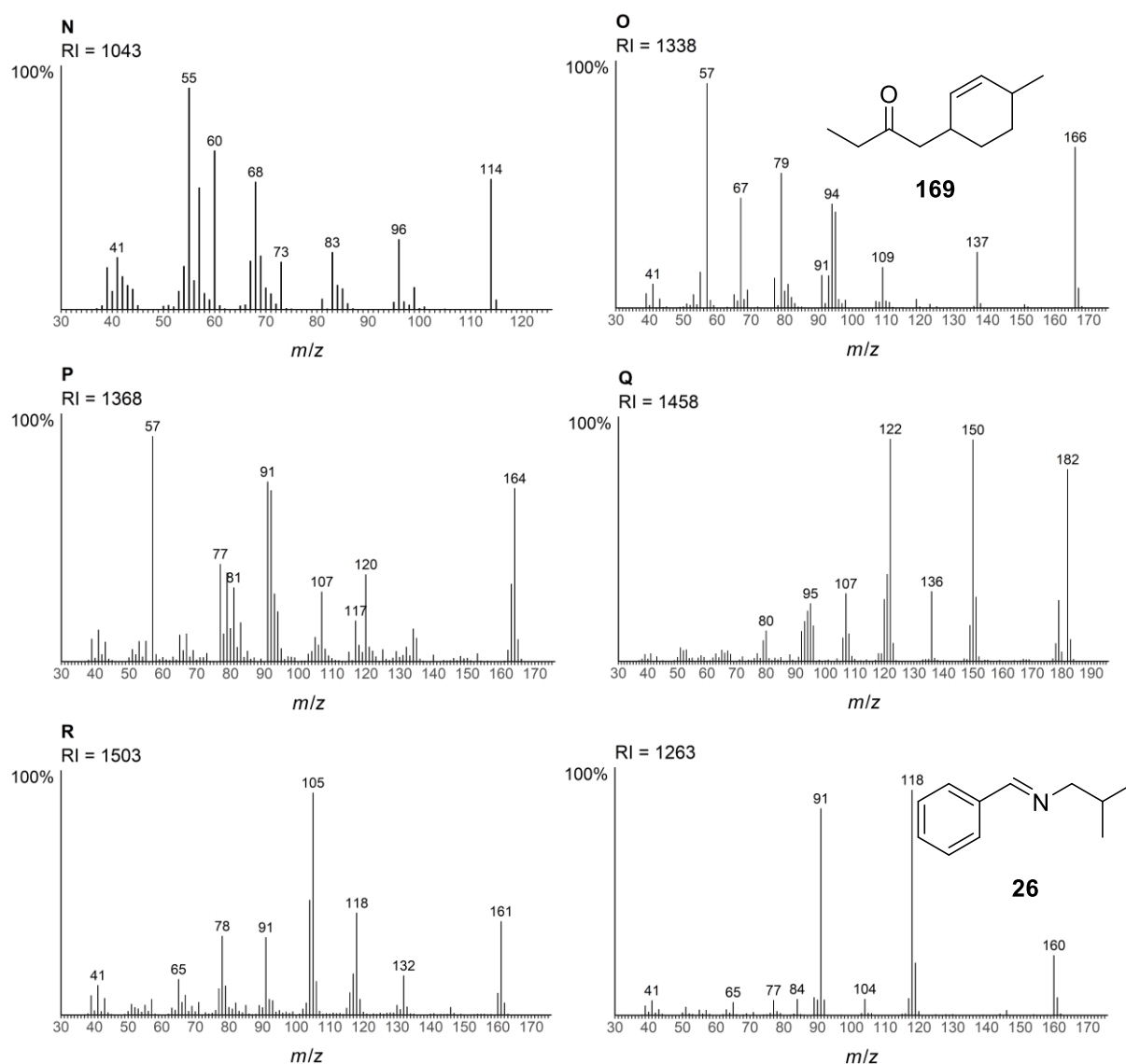


Abbildung 37: Massenspektren der unbekannten Verbindungen **N - R** aus *S. cortisiana* CNY-202, sowie der Strukturvorschlag **169** und Vergleichsspektrum des Imins **26**.

Tabelle 6: Flüchtige Verbindungen aus den Gasphasenextrakten von *S. cortisiana* CNY-202. Die Intensitäten der einzelnen Verbindungen werden mit 0-1% (o), 1-10% (x), 10-30% (xx), 30-100% (xxx) relativ zur Gesamtpeakfläche des Totalionenstromchromatogramms angegeben.

Verbindung	RI _{exp} ^a	RI _{lit} ^b	Ident. ^c	OSSA 1 (THG194)	OSSA 2 (THG195)	OSSA 3 (THG196)	CLSA (THG183)
2,3-Butandion (48)	587	595	ms, ri	o	o	o	-
1-Butanol (90)	665	659	ms, ri	x	x	x	-
2,3-Pentandion (49)	694	698	ms, ri	o	o	o	-
1-Hydroxy-2-propanon (47)	709	665	ms	o	o	o	-
3-Methyl-3-buten-1-ol (51)	724	730	ms, ri	o	o	o	-
Acetoin (7)	734	713	ms	x	x	x	-
(<i>E</i>)-2-Methylbut-2-en-1-ol (52)	768	769	ms, ri	x	x	x	-
3-Methyl-2-butenal (46)	777	782	ms, ri	o	o	o	-
Cyclopentanone (154)	783	791	ms, ri	o	o	x	-
3-Hydroxy-2-pentanone (108)	806			o	-	-	o
Essigsäurebutylester (85)	810	812	ms, ri	-	o	o	-
2-Hydroxy-3-pentanone (96)	814	821	ms, ri	x	o	o	-
4-Methyl-3-hexanon (111)	829	843	ms, ri	o	o	o	-
Verbindung M	833			o	o	o	-

3-Methy-2-butensäuremethylester (97)	838	842	ms, ri	o	o	o	-
Butansäure-S-methylthioester (53)	842		ms	o	o	-	-
1-Hexanol (81)	866	868	ms, ri	o	o	o	o
3-Heptanon (110)	884	887	ms, ri	-	o	o	-
o-Xylol (133)	889	887	ms, ri	-	o	o	-
2,5-Dimethylpyrazin (144)	910	917	ms, ri	xx	x	xx	xx
4-Methyl-2-pentensäuremethylester (86)	930		ms	o	o	o	o
4-Methyl-3-pentensäuremethylester (87)	940		ms	o	o	-	-
2-Hydroxy-5-methylhexan-3-on (95)	944	945	std	o	-	-	x
1-Ethyl-3-methylbenzol (135)	959	957	ms, ri	o	o	o	-
1,3,5-Trimethylbenzol (79)	966	972	ms, ri	o	o	o	o
2-Furansäuremethylester (164)	975	980	ms, ri	x	x	o	o
6-Methyl-5-hepten-2-ol (157)	994	986	ms, ri	-	-	-	o
γ -Thiobutylolacton	995	952	ms	o	o	o	-
Cyclohept-4-enon (136)	1003		ms	o	o	o	-
p-Cymol	1022	1025	ms, ri	-	o	o	o
Benzylalkohol (117)	1032	1036	ms, ri	x	x	x	x
verzweigtes Alkan RI = 1034	1033			-	o	o	-
unbekannt 116, 97, 69, 56, 41	1041			o	o	-	-
Verbindung N	1043			-	-	o	x
(E)-2-(Hydroxyimino)pentan-3-on (58)	1052	1051	ms, std	x	o	x	x
verzweigtes Alkan RI = 1053	1053			o	-	o	-
α -Methylbenzylalkohol (132)	1059	1061	ms, ri	o	o	o	-
verzweigtes Alkan RI = 1064	1064			o	o	-	-
Tetramethylpyrazin (139)	1086	1089	ms, ri	-	-	-	o
Benzoessäuremethylester (168)	1092	1094	ms, ri	x	xx	x	x
2,6-Dimethylcyclohexanol (92)	1104	1112	ms, ri	o	-	o	x
Phenylethylalkohol (107)	1110	1116	ms, ri	x	x	x	xx
1-Phenyl-2-propanon (158)	1126	1124	ms, ri	o	o	o	-
unbekannt 103, 71, 43	1131			-	-	-	o
(E)-2-(Hydroxyimino)hexan-3-on (60)	1141	1142	ms, std	-	-	-	o
γ -Heptalacton (126)	1151	1159	ms, ri	-	-	-	o
2-Phenyl-1-propanol (80)	1170	1179	ms, ri	o	-	o	o
Phenyllessigsäuremethylester (88)	1176	1178	ms, ri	x	x	x	x
δ -Heptalacton (127)	1184		ms	-	-	-	o
Salicylsäuremethylester (147)	1191	1192	ms, ri	o	o	o	o
β -Cyclocitral (143)	1218	1220	ms, ri	-	-	o	o
Cyclohexylisothiocyanat (55)	1228		ms, std	o	-	o	-
2-Cumaranon (160)	1229		ms	o	o	o	-
unbekannt 184, 110, 95, 71, 43	1233			-	-	-	o
Phenyllessigsäureethylester (89)	1243	1246	ms, ri	-	o	o	o
δ -Lacton RI = 1244	1246			o	-	-	o
Geraniol (118)	1255	1255	ms, ri	-	-	-	o
γ -Octalacton (128)	1255	1261	ms, ri	o	o	o	-
Trimethylbenzaldehyd (161)	1313		ms	o	o	o	o
Geraniumsäuremethylester (137)	1323	1324	ms, ri	o	o	o	o
unbekannt 181, 163, 105, 91, 75	1326			o	o	o	-
Verbindung O	1338			-	-	-	o
unbekannt 150, 107, 81, 43	1357			-	-	-	o
γ -Nonalacton (166)	1359	1363	ms, ri	o	o	o	-
Trimethylbenzylalkohol (162)	1360		ms	-	-	-	o
Verbindung P	1368			-	-	-	o
Zimtsäuremethylester (98)	1381	1379	ms, ri	o	o	o	-
δ -Nonalacton (177)	1389	1404	ms, ri	-	-	-	o
Salinilacton A (16)	1410	1410	ms, std	-	-	-	o
unbekannt 154, 125, 111, 69	1436			-	-	-	x
Geranylaceton (165)	1452	1453	ms, ri	-	o	o	o
Verbindung Q	1458			-	-	-	o
γ -Decalacton (167)	1465	1470	ms, ri	o	-	o	o
Salinilacton B (17)	1468	1468	ms, std	-	-	-	o
Methylester RI = 1476	1476			o	o	o	o
Verbindung K	1481			o	-	-	o

β -Ionon (122)	1484	1486	ms, ri	o	o	o	x
Verbindung R	1502			o	o	o	x
unbekannt 212, 181, 128	1510			o	o	o	o
Dihydroactinidiolid (78)	1525	1538	ms, ri	o	o	o	o
verzweigter Methylester RI = 1536	1536			-	-	-	o
verzweigter Methylester RI = 1575	1575			-	-	-	o
Terpenoid RI = 1611	1612			o	o	-	o
Methylester M = 240	1681			-	-	o	o
Diterpen 272, 229, 136	1706			o	o	o	-
Diterpen 272, 229, 159, 145	1808			o	o	o	-
Diterpen 272, 229, 173, 159, 145	1830			o	o	o	-
unbekannt 242, 132, 119, 95	1848			o	o	o	-

^adie angegebenen Werte sind Durchschnittswerte aller Messungen, ^bentnommen aus NIST Chemistry WebBook oder unserer eigenen Datenbank, ^cIdentifizierung der Verbindung beruht auf Vergleich des Massenspektrums mit Datenbank Spektrum (ms), Vergleich des Retentionsindex mit Literaturwerten gemessen auf einer gleichartigen Fused-Silica-Kapillarsäule (ri) und/oder direkter Vergleich mit einer synthetischen oder kommerziell erhältlichen Referenz-Verbindung (std)

3.2.8. *Salinispora vitiensis* (CNS-055)

Der Stamm *S. vitiensis* CNS-055 wurde erstmals aus marinen Sedimenten vor der Küste von Palau isoliert und bildet zusammen mit dem Typenstamm CNT-148 und CNT-801 die neue Spezies *S. vitiensis*. Benannt wurde sie nach „Viti Levu“, dem Namen der indigenen Bevölkerung der Insel Fiji, wo der Typenstamm erstmals isoliert worden ist.^[36,37] Das Duftprofil des untersuchten Stammes weist nur eine geringe Anzahl an flüchtigen Verbindungen auf, von denen die meisten bekannt sind. Auffällig waren die Unterschiede in die Zusammensetzung der Hauptkomponenten von CLSA und OSSA (Abbildung 38). Im CLSA-Extrakt bilden 2,5-Dimethylpyrazin (**144**) und Phenylethylalkohol (**107**) die beiden Hauptkomponenten, wohingegen in den OSSA Replikaten **144** und große Mengen an 2,3,5-Trimethylpyrazin (**170**) vorkommen. Weiterhin war Benzylalkohol (**117**) nur in Spuren vorhanden. Neben den beiden Pyrazinen **144** und **170** wurde noch **139** in geringen Mengen gefunden. Von den Oximen konnte erneut nur **58** und in wesentlich geringeren Konzentrationen **59** im CLSA-Extrakt identifiziert werden. Auch von den Salinilactonen kommt nur **16** in geringen Mengen vor. Dafür wurden die α -Hydroxyketone **94-96** und **108** gefunden, die sowohl biosynthetische Vorläufer der Pyrazine^[99] sind, als wohl auch an der Bildung der Oxime beteiligt sind.

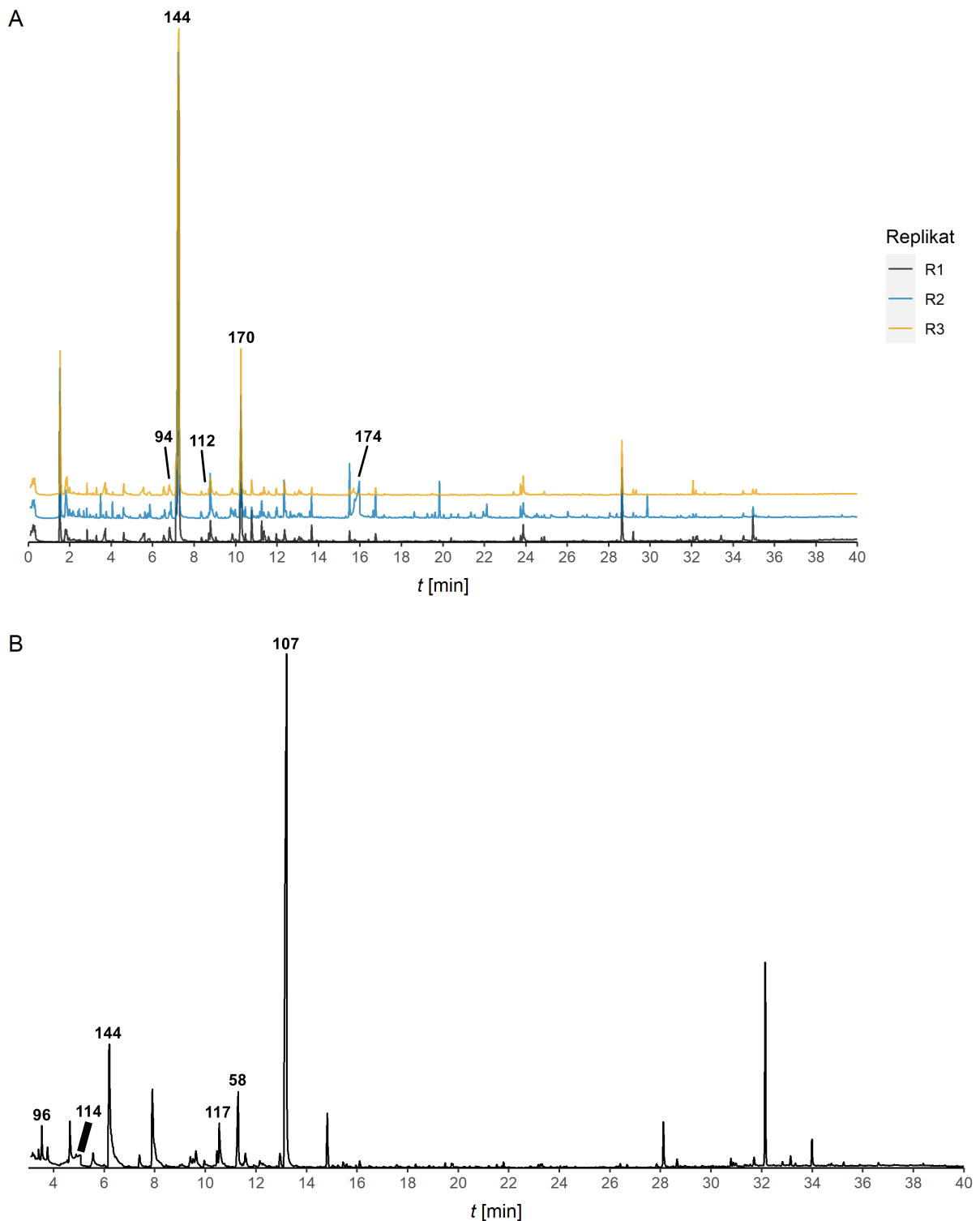


Abbildung 38: Totalionenstromchromatogramme der OSSA (A) und CLSA (B) aus *S. vitensis* CNS-055.

Des Weiteren wurden noch diverse Ketone wie 3-Methyl-2-pentanon (**171**), **110**, 2-Heptanon (**172**), **131**, **112**, **173** und aromatischen Verbindungen wie **74**, **75**, **88**, **89**, **119**, **132**, **145**, **158**, Benzoesäure (**174**), sowie das Imin **26** von dem Bakterium produziert. 6-Methyl-5-hepten-2-on (**173**) zählt wie **122** und **78** zu den Norcarotenoiden und ist bereits aus vielen Cyanobakterien bekannt.^[4] 3,5-Dimethyl-2-cyclohexen-1-on

(175) ist bisher nicht aus Bakterien bekannt, konnte aber in Zigarettenrauch nachgewiesen werden.^[100] Benzoessäure (174) kommt als Abbauprodukt von Phthalaten in *Mycobacterium* sp. YC-RL4 und anderen Bodenbakterien vor.^[101] Eine große Anzahl verschiedener Imine wie auch 26 wurden bereits in *S. pacifica* CNS-863 und anderen Bakterien wie *Vibrio* sp. gefunden.^[44] Weiterhin werden die schwefelhaltigen Verbindung 119 und Dihexyldisulfid (176) vom Bakterium produziert. DMDS (3) ist eine weit verbreitete bakterielle Verbindung.^[4,50] Derivate mit längeren Seitenketten sind hingegen eher selten zu finden. 176 konnte erstmals aus bakteriellem Ursprung nachgewiesen werden. Erneut traten auch einige γ - und δ -Lactone (127-129, 177) auf (Abbildung 39).

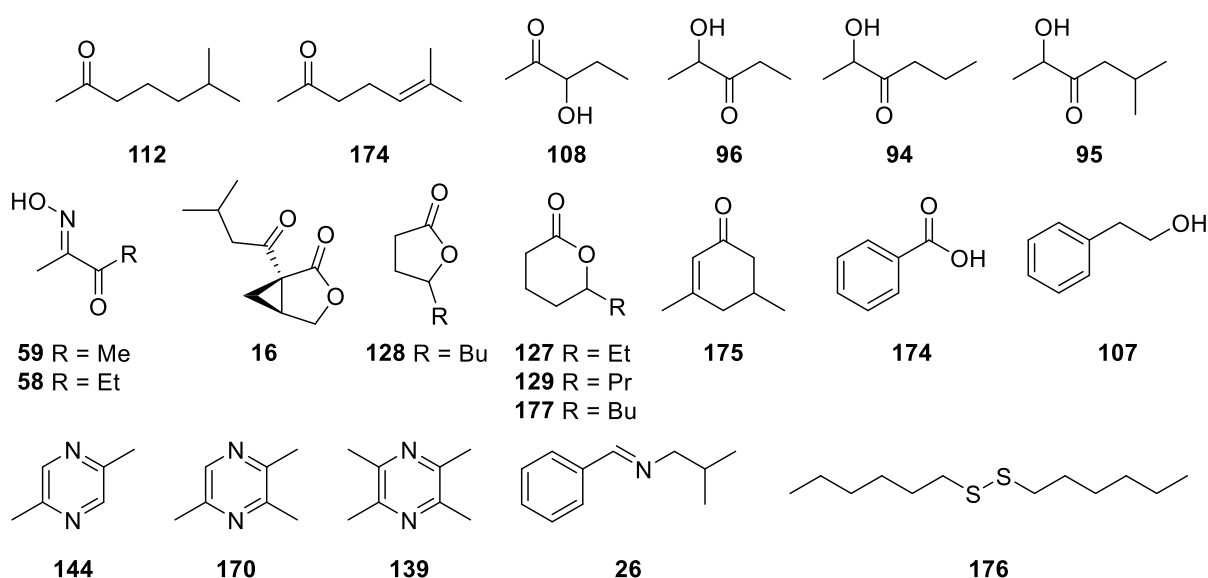


Abbildung 39: Strukturen flüchtiger Substanzen aus *S. vitisensis* CNS-055.

Tabelle 7: Flüchtige Verbindungen aus den Gasphasenextrakten von *S. vitisensis* CNS-055. Die Intensitäten der einzelnen Verbindungen werden mit 0-1% (o), 1-10% (x), 10-30% (xx), 30-100% (xxx) relativ zur Gesamtpeakfläche des Totalionenstromchromatogramms angegeben.

Verbindung	RI _{exp} ^a	RI _{lit} ^b	Ident. ^c	OSSA 1 (THG200)	OSSA 2 (THG201)	OSSA 3 (THG202)	CLSA (THG180)
3-Methyl-2-pentanone (171)	745	752	ms, ri	o	o	o	-
2,3-Hexandione (61)	778	786	ms, ri	-	o	x	-
3-Hydroxy-2-pentanone (108)	810		ms	-	-	-	o
2-Hydroxy-3-pentanone (96)	815	821	ms, ri	-	-	-	x
4-Hydroxy-4-methyl-2-pentanone (131)	846	838	ms, ri	o	-	-	o
3-Methylbutansäure (115)	854	863	ms, ri	x	-	x	-
2-Methylbutansäure (114)	875	861	ms, ri	-	-	-	x
unbekannt 87, 59, 43	876			o	-	o	-
3-Heptanon (110)	884	887	ms, ri	o	o	-	-
2-Heptanon (172)	890	891	ms, ri	o	-	o	-
o-Xylol (133)	891	887	ms, ri	-	o	-	o
2-Hydroxy-3-hexanon (94)	897	896	ms, ri	x	o	x	-
2,5-Dimethylpyrazin (144)	912	917	ms, ri	xxx	xxx	xxx	xx
α -Pinen (76)	933	937	ms, ri	-	-	-	o

2-Hydroxy-5-methylhexan-3-on (95)	944	945	ms, std	o	-	o	-
2-Methylbutanolid (56)	950	948	ms, ri	o	-	o	-
6-Methyl-2-heptanon (112)	954	956	ms, ri	x	o	x	-
(E)-3-(Hydroxyimino)butan-2-on (59)	962	961	ms, std	-	-	-	o
1-Heptanol (91)	974	970	ms, ri	-	-	-	o
6-Methyl-5-hepten-2-on (173)	989	986	ms, ri	-	-	-	o
2,3,5-Trimethylpyrazin (170)	1000	1004	ms, ri	xx	x	xx	o
Benzylalkohol (117)	1033	1036	ms, ri	x	o	x	x
Salicylaldehyd (145)	1040	1047	ms, ri	o	o	o	o
(E)-2-(Hydroxyimino)pentan-3-on (58)	1056	1051	ms, std	-	-	-	x
2-Acetylpyrrol (74)	1060	1064	ms, ri	o	-	-	o
α -Methylbenzylalkohol (132)	1061	1061	ms, ri	-	-	o	o
Tetramethylpyrazin (139)	1085	1089	ms, ri	o	o	o	o
Verbindung H	1088			-	o	o	-
3,5-Dimethyl-2-cyclohexen-1-on (175)	1099		ms	-	o	o	-
Phenylethylalkohol (107)	1111	1116	ms, ri	o	o	o	xxx
1-Phenyl-2-propanon (158)	1126	1124	ms, ri	o	o	o	-
Menthol (77)	1171	1174	ms, ri	o	o	o	-
Benzoessäure (174)	1171	1170	ms, ri	o	x	x	-
Phenyllessigsäuremethylester (88)	1177	1178	ms, ri	-	-	-	o
δ -Heptalacton (127)	1184		ms	-	-	-	o
unbekannt 148, 127, 70, 58	1193			o	-	o	-
Benzothiazol (119)	1228	12229	ms, ri	o	o	o	-
Phenyllessigsäureethylester (89)	1244	1246	ms, ri	o	-	o	-
γ -Octalacton (128)	1256	1261	ms, ri	o	-	o	-
(E)-N-isobutyl-1-phenylmethanimin (26)	1265	1263	ms, std	-	o	o	-
δ -Octalacton (129)	1282	1288	ms, ri	-	-	-	o
2-Acetylanilin (75)	1297	1308	ms, ri	o	o	o	-
Geraniumsäuremethylester (137)	1324	1324	ms, ri	-	-	-	o
unbekannt 154, 111, 99, 84, 71, 55, 43	1334			-	-	-	o
δ -Nonalacton (177)	1388	1404	ms, ri	-	-	-	o
Salinilacton A (16)	1411	1410	ms, std	-	-	-	o
Geranylaceton (165)	1452	1453	ms, ri	o	-	o	o
Dihexyldisulfid (176)	1706		ms	-	o	o	-

^adie angegebenen Werte sind Durchschnittswerte aller Messungen, ^bentnommen aus NIST Chemistry WebBook oder unserer eigenen Datenbank, ^cIdentifizierung der Verbindung beruht auf Vergleich des Massenspektrums mit Datenbank Spektrum (ms), Vergleich des Retentionsindex mit Literaturwerten gemessen auf einer gleichartigen Fused-Silica-Kapillarsäule (ri) und/oder direkter Vergleich mit einer synthetischen oder kommerziell erhältlichen Referenz-Verbindung (std)

3.2.9. *Salinispora mooreana* (CNS-237)

Die neue *Salinispora* Spezies "*mooreana*" wurde nach Bradley Moore benannt, der einen erheblichen Beitrag zur Aufklärung von Biosynthesewegen von Naturstoffen aus *Salinispora* leistete.^[37] Isoliert wurde der untersuchte Stamm erstmals 2004 aus marinen Sedimenten vor der Küste von Palau.^[36,37]

Die Hauptbestandteile der Gasphasenextrakte (Abbildung 40) machen das Pyrazin **144** und der Alkohol **107** aus. Daneben konnten nur wenige neue Verbindungen gefunden werden. Das Duftprofil zeichnet sich vor allem durch viele bekannte aliphatische und aromatische Alkohole und Carbonsäureester aus. Die beiden Alkohole 2-Cyclohexen-1-methanol (**12**) und 2-Cyclohexen-1-ethanol (**13**) konnten zuvor in CNB-440 nachgewiesen werden und sind Produkte des Shikimat-Biosynthese-Weges.^[41] Ebenso wurde die verwandte Verbindung **14**, nicht aber das Isomer **15** gefunden. Die Salinilactone **16** und **17** werden in größeren Mengen produziert. Zusätzlich kommen noch **18-21** in geringeren Konzentration vor. Als stickstoffhaltige Verbindung konnte neben den Pyrazinen in den OSSA Replikaten erstmals Capronitril (**178**) gefunden werden. Einige längere aliphatische Cyanide sind bereits aus *Actinomyceten* bekannt.^[50] Das Nitril **178** ist aus unterschiedlichen Quellen wie Zigarettenrauch und verschiedenen Pilzen bekannt.^[100,102] Als bakterieller Naturstoff wurde es bisher nicht identifiziert. Eine weitere neue Verbindung ist 4-Methylheptan-3,5-dion (**179**). β -Diketone sind aus Streptomyceten bekannt, wobei langkettige Diketone meistens aus Lipiden stammen.^[41] Ebenso konnte auch Cyclohexanon (**180**) bereits schon in *Streptomyces coelicolor* gefunden werden.^[50] Weiterhin konnten mit Pentansäureethylester (**148**) und 4-Methylpentansäureethylester (**181**) zwei Carbonsäureethylester nachgewiesen werden.

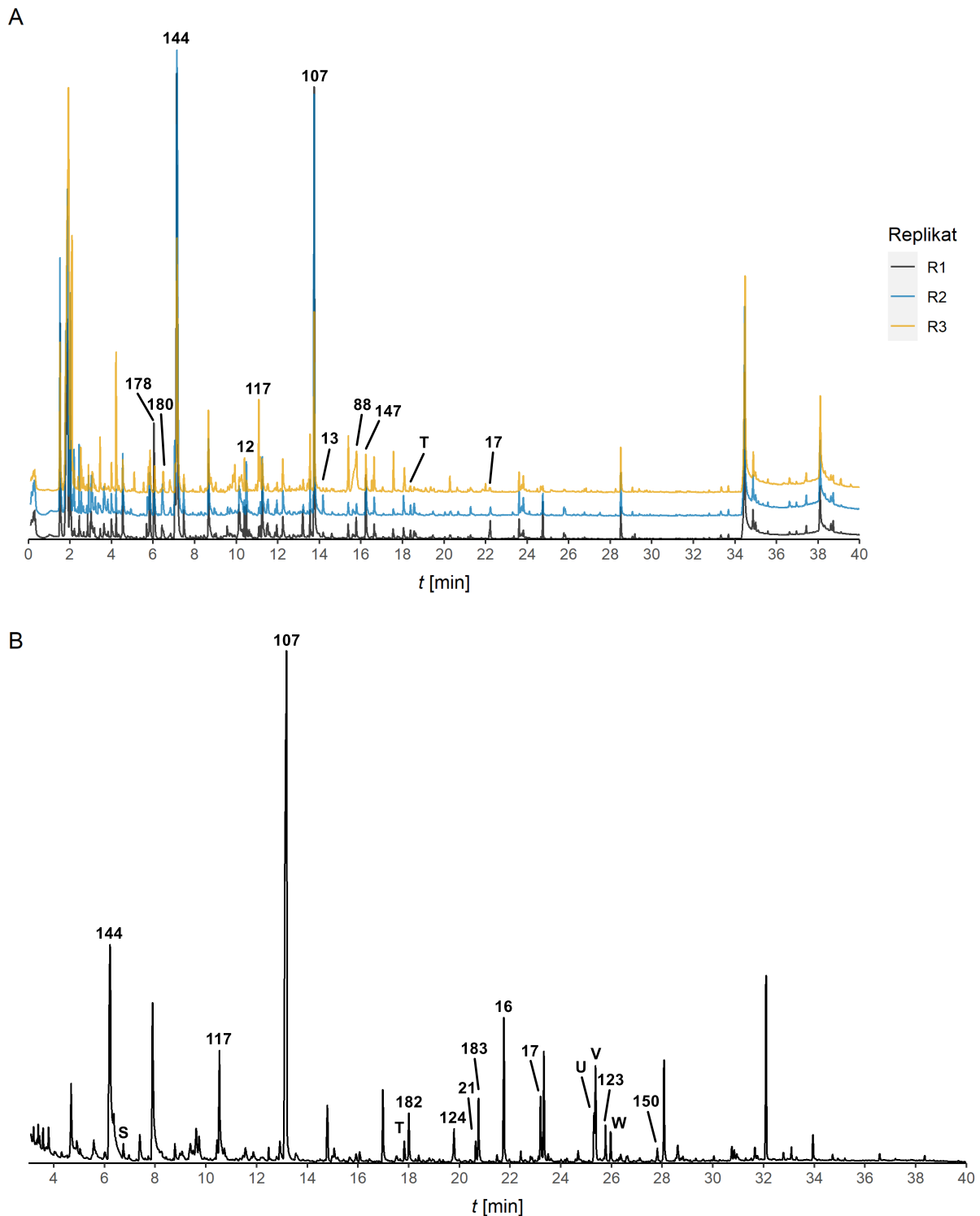


Abbildung 40: Totalionenstromchromatogramme der OSSA (A) und CLSA (B) aus *S. mooreana* CNS-237.

Erstmals finden sich in den untersuchten *Salinispora* Stämmen keine Oxime, obwohl auch von diesem Stamm einige Hydroxyketone wie **7**, **96** und **108** produziert werden. Neben 1-Decanol (**182**) und 1-Undecanol (**183**) wurden noch die fünf interessanten Verbindungen **S-W** in den Extrakten gefunden (Abbildung 42). Für keine der Verbindungen ergab eine Datenbanksuche einen passenden Treffer.

Die Massenspektren von **S** und **T** zeigen wenig charakteristische Ionen, sodass keine möglichen Strukturen identifiziert werden konnten. Ein hochaufgelöstes Massenspektrum von **T** zeigte, dass das Ion $m/z = 156$ als Molpeak mit der Summenformel $C_9H_{16}O_2$ (gemessen 156.1138, berechnet 156.1150) fungiert.

Die Peaks von **U** und **V** überlagern sich leicht. Weiterhin koeluiert noch mind. eine weitere Verbindung, sodass keine sauberen Massenspektren erhalten wurden. Die Summenformel von **U** wurde durch HRMS zu $C_{13}H_{22}O_2$ (gemessen 210.16527, berechnet 210.16198) bestimmt. Die Ionen $m/z = 57$, 153 wurden als Fragmente eines Ethylketons identifiziert. Leider konnte mittels der übrigen Fragment-Ionen nicht auf eine Struktur geschlossen werden.

Das Fragment $m/z = 154$ der Verbindung **V** besitzt die Summenformel $C_{10}H_{18}O$ (gemessen 154.13623, berechnet 154.13576). Die Ionen $m/z = 107$, 136 entstehen jeweils durch einen Massenverlust von 18 amu – ein Hinweis auf einen Alkohol. Zugleich spricht das Fragment $m/z = 57$ für ein Ethylketon. **V** könnte somit mehr als ein Sauerstoffatom besitzen und das Molekül-Ion würde beispielweise die Masse von $m/z = 172$ besitzen.

Aufgrund der ungeraden Masse des Fragment-Ions $m/z = 185$ wurde für **W** zunächst eine stickstoffhaltige Verbindung vermutet. Durch eine HRMS-Messung zeigte sich, dass das Fragment-Ion eine Summenformel von $C_9H_{13}O_4$ (gemessen 185.08164, berechnet 185.08138) besitzt und nicht der Molpeak der Verbindung sein kann. Auffällig ist die hohe Anzahl von Sauerstoffatomen, allerdings konnte anhand des Fragmentes $m/z = 57$ nur eine Carbonylfunktion zugeordnet werden.

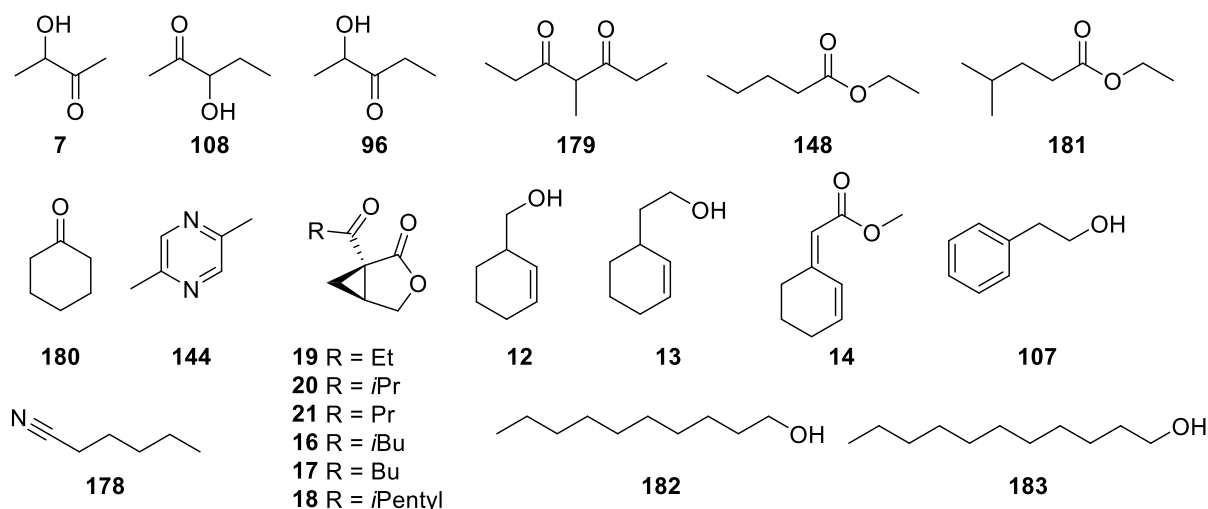


Abbildung 41: Strukturen flüchtiger Substanzen aus *S. mooreana* CNS-237.

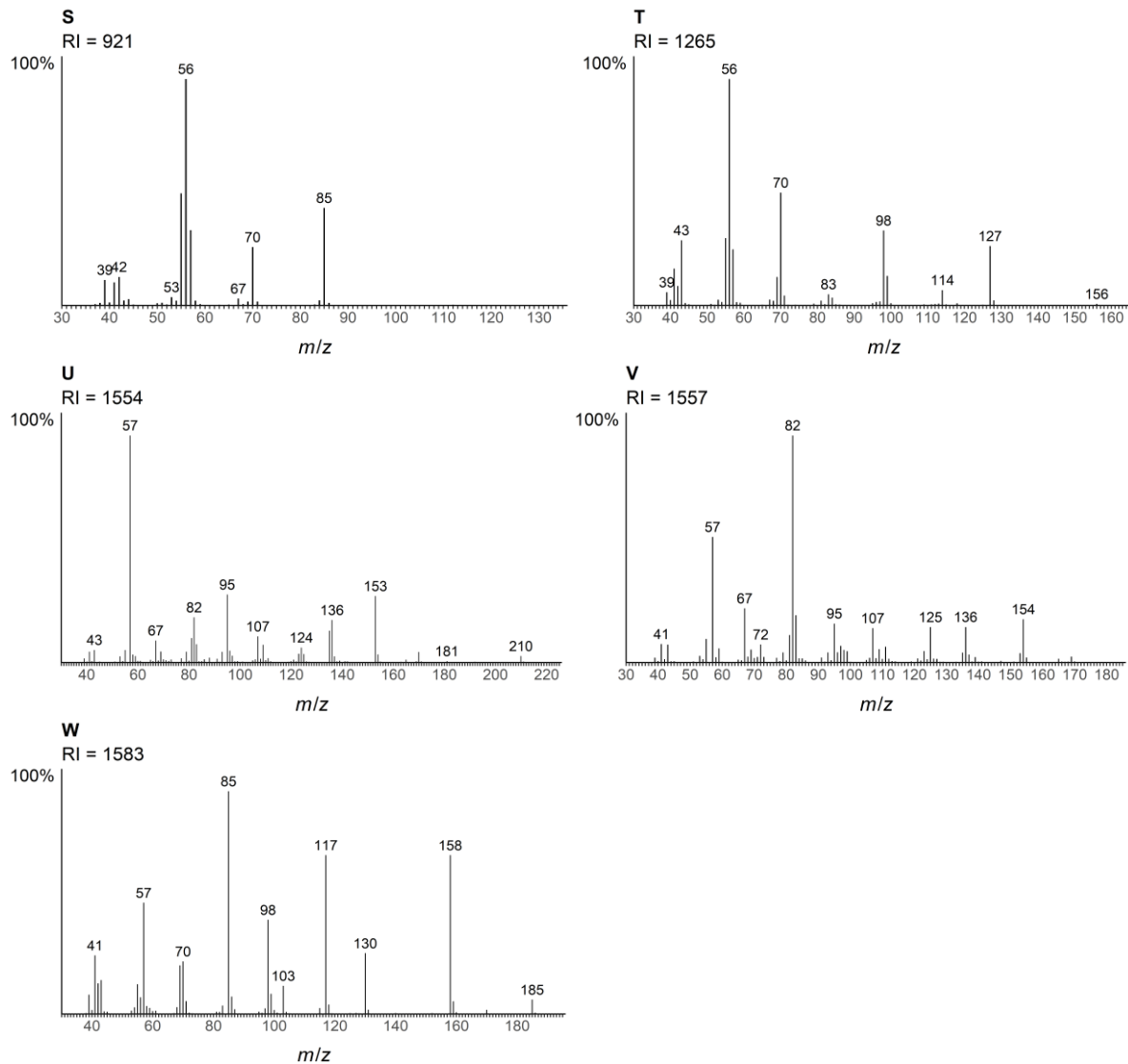


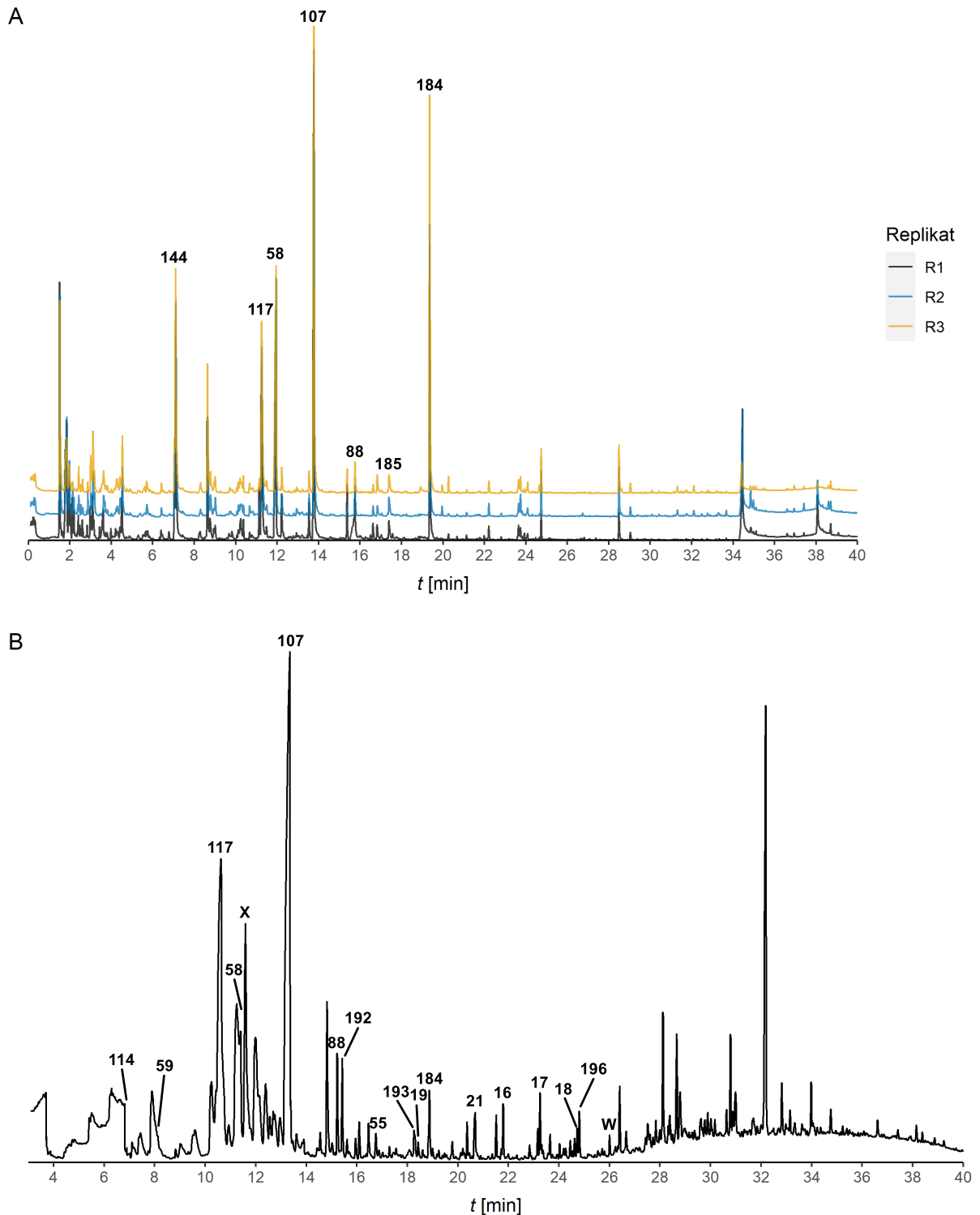
Abbildung 42: Massenspektren der unbekannten Verbindungen **S-W** aus *S. mooreana* CNS-237.

Tabelle 8: Flüchtige Verbindungen aus den Gasphasenextrakten von *S. mooreana* CNS-237. Die Intensitäten der einzelnen Verbindungen werden mit 0-1% (o), 1-10% (x), 10-30% (xx), 30-100% (xxx) relativ zur Gesamtpeakfläche des Totalionenstromchromatogramms angegeben.

Verbindung	RI _{exp} ^a	RI _{lit} ^b	Ident. ^c	OSSA 1 (THG234)	OSSA 2 (THG235)	OSSA 3 (THG236)	CLSA (THG186)
3-Methyl-3-buten-1-ol (51)	729	730	ms, ri	o	-	o	-
Acetoin (7)	740	713	ms	o	o	o	-
(E)-2-Methylbut-2-en-1-ol (52)	770	769	ms, ri	o	o	-	-
3-Hydroxy-2-pentanon (108)	811		ms	o	o	-	o
2-Hydroxy-3-pentanon (96)	817	821	ms, ri	-	-	-	o
2-Ethyl-2-pentenal (187)	826	837	ms, ri	o	o	o	-
Verbindung M	833			o	o	o	o
4-Hydroxy-4-methyl-2-pentanon (131)	845	838	ms, ri	-	-	-	o
1-Hexanol (81)	867	869	ms, ri	x	x	x	o
Capronitril (178)	872	877	ms, ri	x	o	o	-
Cyclohexanon (180)	888	894	ms, ri	o	o	-	-
Pentansäureethylester (148)	903	900	ms, ri	o	o	-	o
Pyrazin M108	907			x	x	o	-
2,5-Dimethylpyrazin (144)	910	917	ms, ri	xx	xx	x	xx
Verbindung S	921			o	o	o	o
α-Pinen (76)	932	937	ms, ri	-	-	-	o

2-Methylbutanolid (56)	949	948	ms, ri	o	o	-	o
3-Methylbutanolid (57)	957		ms	o	o	-	-
1,3,5-Trimethylbenzol (79)	964	927	ms, ri	-	-	o	o
4-Methylpentansäureethylester (181)	966	969	ms, ri	o	o	-	o
1-Heptanol (91)	973	970	ms, ri	o	o	o	o
1-Ethyl-2-methylbenzol	977	970	ms, ri	-	-	-	o
4-Methyl-3-pentensäure (83)	982	1011	ms	o	o	o	o
6-Methyl-5-hepten-2-on (173)	989	986	ms, ri	-	-	-	o
Cyclohept-4-enon (136)	1002		ms	o	o	-	-
2-Cyclohexen-1-methanol (12)	1009	1011	ms, ri	o	x	o	o
unbekannt 99, 84, 70, 55	1013			o	o	o	-
Benzylalkohol (117)	1032	1036	ms, ri	x	x	x	x
unbekannt 140, 125, 97, 69, 41	1035			o	o	-	o
Salicylaldehyd (145)	1039	1047	ms, ri	o	o	o	o
4-Methylheptan-3,5-dion (179)	1053	1056	ms, ri	o	o	o	-
α-Methylbenzylalkohol (132)	1059	1061	ms, ri	o	o	-	o
2-Ethyl-1,4-dimethylbenzol (146)	1075	1074	ms, ri	-	-	o	o
Benzoessäuremethylester (168)	1092	1094	ms, ri	o	o	o	o
2,6-Dimethylcyclohexanol (92)	1103	1112	ms, ri	-	-	-	o
Phenylethylalkohol (107)	1110	1116	ms, ri	x	x	x	x
2-Cyclohexen-1-ethanol (13)	1123	1120	ms, ri	-	-	-	o
2-Phenyl-1-propanol (80)	1170	1179	ms, ri	o	o	-	o
Phenyllessigsäuremethylester (88)	1176	1178	ms, ri	o	o	-	o
Salicylsäuremethylester (147)	1191	1192	ms, ri	x	o	x	o
unbekannt M154	1206			o	-	o	-
unbekannter Alkohol RI = 1235	1236			o	o	-	x
Phenyllessigsäureethylester (89)	1243	1246	ms, ri	o	o	-	-
unbekannt 122, 104, 91, 85, 43	1254			o	o	-	-
Verbindung T	1265			o	o	o	o
1-Decanol (182)	1271	1273	ms, ri	o	o	o	x
(Z)-Methyl 2-(cyclohex-2-enyliden)acetat (14)	1274	1274	ms, ri	o	o	o	-
δ-Octalacton (129)	1280	1288	ms, ri	-	-	-	o
Salinilactone D (19)	1285	1285	ms, std	-	-	-	o
Keton 126, 97, 86, 70, 57	1304			o	o	o	o
Salinilacton E (20)	1314	1315	ms, std	-	-	-	o
unbekannt 181, 163, 105, 91, 75	1326			o	o	-	-
9-Methyl-1-decanol (124)	1336		ms	o	o	-	o
Salinilacton F (21)	1368	1368	ms, std	o	-	-	o
1-Undecanol (183)	1372	1371	ms, ri	o	o	o	x
unbekannt 182, 139, 124, 95, 82, 67, 54, 42	1407			o	-	o	-
Salinilacton A (16)	1409	1410	ms, std	o	o	o	x
unbekannter Alkohol RI = 1436	1436			-	-	-	o
δ-Lacton RI = 1454	1454			-	-	-	o
Salinilacton B (17)	1467	1468	ms, std	o	-	-	x
1-Dodecanol	1472	1473	ms, ri	o	o	o	x
Verbindung K	1479			-	-	-	o
β-Ionon (122)	1484	1486	ms, ri	-	-	-	o
Dihydroactinidiol (78)	1524	1538	ms, ri	-	-	-	o
Salinilacton C (18)	1528	1527	ms, std	-	-	-	o
Verbindung U	1554			o	o	-	o
Verbindung V	1557			-	-	-	x
1-Tridecanol (123)	1573	1577	ms, ri	-	-	-	o
Verbindung W	1583			-	-	-	o
Terpenoid RI = 1611	1618			-	-	-	o
Diocetylther (150)	1663	1659	ms, ri	-	-	-	o

^adie angegebenen Werte sind Durchschnittswerte aller Messungen, ^bentnommen aus NIST Chemistry WebBook oder unserer eigenen Datenbank, ^cIdentifizierung der Verbindung beruht auf Vergleich des Massenspektrums mit Datenbank Spektrum (ms), Vergleich des Retentionsindex mit Literaturwerten gemessen auf einer gleichartigen Fused-Silica-Kapillarsäule (ri) und/oder direkter Vergleich mit einer synthetischen oder kommerziell erhältlichen Referenz-Verbindung (std)

3.2.10. *Salinispora oceanensis* (CNT-029)Abbildung 43: Totalionenstromchromatogramme der Ossa (A) und CLSA (B) aus *S. oceanensis* CNT-029.

Bei dem Stamm CNT-029 handelt es sich um einen Vertreter der neuen Spezies *S. oceanensis*. Er wurde 2006 zusammen mit dem Typenstamm CNT-138^T aus marinen Sedimenten von den Fiji-Inseln isoliert und besitzt wie die meisten anderen *Salinispora* Bakterien eine orangene Farbe.^[36,37] Die TICs der GC/MS Analysen sind in Abbildung

43 zu sehen. Die Duftprofile der CLSA und OSSA unterscheiden sich deutlich voneinander. So machen das Pyrazin **144**, die Alkohole **117** und **107**, das C₅-Oxim **58**, sowie 2-Methylchinolin (**184**) die Hauptkomponenten in den Replikaten der OSSA aus. Im CLSA-Extrakt kommen hauptsächlich **117** und **107**, begleitet von **58**, größeren Mengen an 2-Methylbutansäure (**114**) und nicht näher bestimmten Kohlenwasserstoffen vor. Chinoline treten hauptsächlich als Umweltverunreinigungen auf und es konnte gezeigt werden, dass einige Bakterien aus Belebtschlammbecken in der Lage sind, **184** als ihre Kohlenstoffquelle zu nutzen.^[103] 4-Methylchinolin ist bereits aus *Myxococcus Xanthus* und *S. aurantiaca* bekannt^[4], jedoch konnte weder Chinolin (**185**) noch **184** bisher als bakterieller Naturstoff identifiziert werden. Da die Verbindungen nicht in den Blindproben, dafür in allen untersuchten Proben unabhängig voneinander vorkamen, wird eine Verunreinigung ausgeschlossen. Als weitere VOCs konnten die Aldehyde 2-Methyl- und 2-Ethyl-2-butenal (**186**, **187**), Tridecanal (**188**), die Säuren Pentansäure (**189**), **116**, **83**, sowie der Ester 3-Hydroxybutansäureethylester (**190**) in geringeren Mengen gefunden werden (Abbildung 44). **190** ist zusammen mit Tropon (**191**) aus dem Roseobakterium *Phaeobacter gallaeciensis* DSM17395 bekannt.^[104]

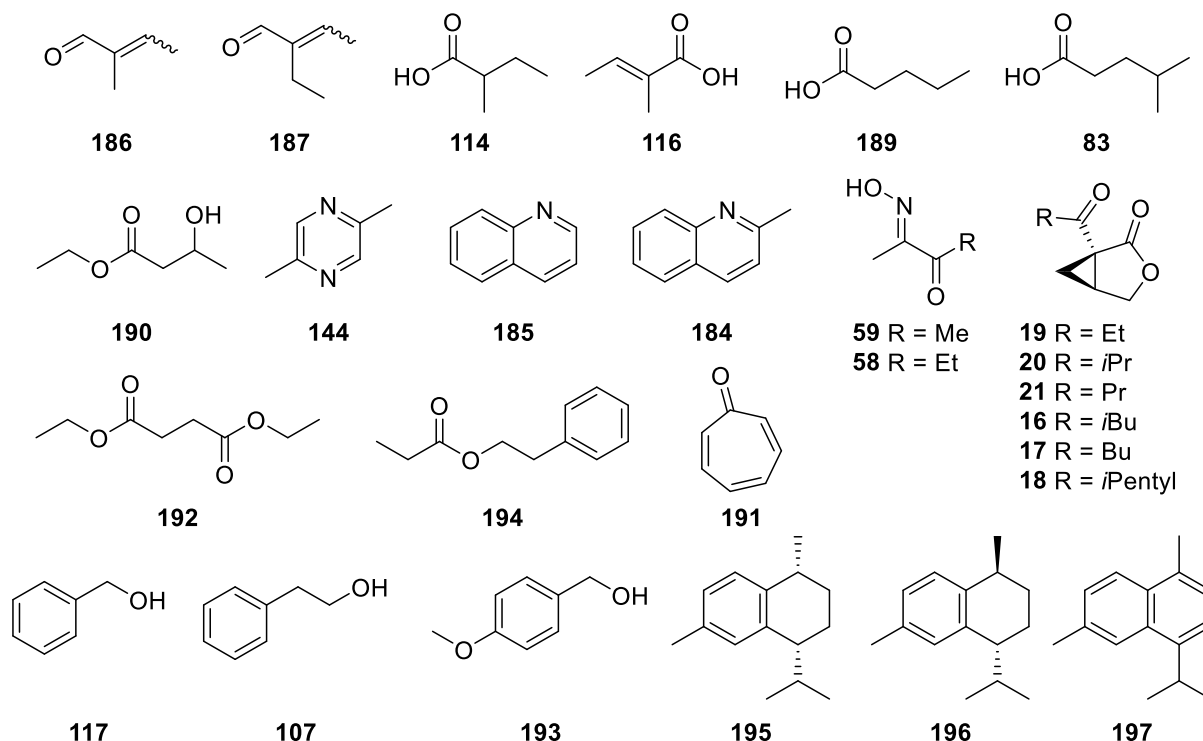


Abbildung 44: Strukturen flüchtiger Substanzen aus *S. oceanensis* CNT-029.

Weiterhin wurde Bernsteinsäurediethylester (**192**) im Duftprofil nachgewiesen. Die Verbindung ist unter anderem aus Wein^[105] bekannt und konnte bereits in anderen Analysen des *Salinispora*-Stamms CNS-863 zusammen mit der unbekannten Verbindung **X** beobachtet werden (Abbildung 45). Die Summenformel des Fragment-Ions $m/z = 145$ von **X** wurde durch HRMS zu $C_5H_{13}N_3O_2$ (gemessen 145.08810, berechnet 145.08513) bestimmt. Aufgrund der weiteren Fragmente kann es sich hierbei ebenfalls nicht um das Molekül-Ion der Verbindung handeln. Da **X** sehr flüchtig ist und auch durch andere Verbindungen überlagert wird, konnte kein IR-Spektrum gemessen werden. Ein Strukturvorschlag auf Grundlage des Massenspektrums allein ist nicht möglich. Neben **X** wurden auch die unbekannten Verbindungen **N** und **W** in CNT-209 gefunden. *p*-Methoxybenzylalkohol (**193**) und Propansäure-2-phenylethylester (**194**) sind beide nicht aus bakteriellem Ursprung bekannt. **193** konnte jedoch in Pilzen^[106] und **194** in verschiedenen Pflanzen^[107] nachgewiesen werden. Weiterhin produziert der untersuchte *Salinispora*-Stamm eine große Menge an Salinilactonen (**16-21**). Daneben traten noch die Sesquiterpene (*Z*)- und (*E*)-Calamenen (**195**, **196**) im CLSA Extrakt auf. Zusätzlich wurde auch das Dehydrierungsprodukt Cadalen (**197**) und die langkettigen Kohlenwasserstoff 3-Methylpentadecan (**198**) und 3-Methylheptadecan (**199**) neben einigen unbekannten Diterpenen beobachtet. **195** ist mit weiteren Sesquiterpen unter anderem aus *Streptomyces caviscabies* bekannt.^[4]

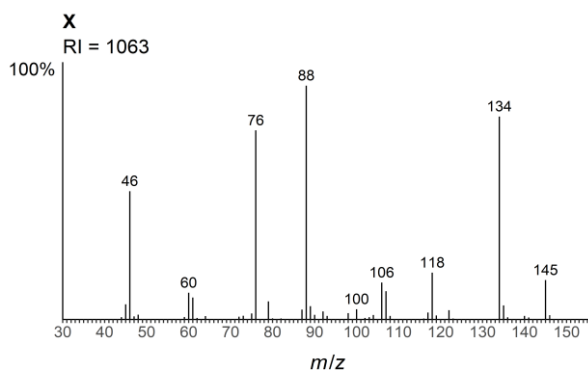


Abbildung 45: Massenspektrum der unbekannten Verbindung **X**.

Tabelle 9: Flüchtige Verbindungen aus den Gasphasenextrakten von *S. oceanensis* CNT-029. Die Intensitäten der einzelnen Verbindungen werden mit 0-1% (o), 1-10% (x), 10-30% (xx), 30-100% (xxx) relativ zur Gesamtpeakfläche des Totalionenstromchromatogramms angegeben.

Verbindung	RI _{exp} ^a	RI _{lit} ^b	Ident. ^c	OSSA 1 (THG240)	OSSA 2 (THG241)	OSSA 3 (THG242)	CLSA (THG182)
2,3-Pentandion (49)	698	698	ms, ri	o	o	o	-
2-Methyl-2-butenal (186)	734	746	ms, ri	o	o	o	-
Acetoin (7)	739	713	ms	o	o	o	-
(<i>E</i>)-2-Methylbut-2-en-1-ol (52)	770	769	ms, ri	-	o	o	-

Duftprofilanalyse verschiedener *Salinispora*-Spezies

3-Methyl-2-butenal (46)	778	782	ms, ri	o	o	o	-
3-Hydroxy-2-pentanon (108)	807	821	ms, ri	o	o	o	-
2-Hydroxy-3-pentanon (96)	813	821	ms, ri	o	o	o	-
2-Ethyl-2-pentenal (187)	825	837	ms, ri	o	o	o	-
2-Methylbutansäure (114)	858	861	ms	o	o	o	x
o-Xylol (133)	890	887	ms, ri	o	-	-	o
2,5-Dimethylpyrazin (144)	911	917	ms, ri	x	x	o	x
Pentansäure (189)	932 ^d	904	ms	-	-	-	o
Tiglinsäure (116)	935	928	ms, ri	-	-	-	o
3-Hydroxybutansäureethylester (190)	940	944	ms, ri	-	-	-	o
6-Methyl-2-heptanon (112)	952	956	ms, ri	o	o	o	-
(E)-3-(Hydroxyimino)butan-2-on (59)	960	961	ms, std	-	o	o	o
6-Methyl-2-heptanol (82)	965		ms	o	o	o	-
1-Heptanol (91)	972	970	ms, ri	o	-	o	-
1-Ethyl-2-methylbenzol	978	970	ms, ri	-	-	-	o
4-Methyl-3-pentensäure (83)	984	1011	ms	-	-	-	o
6-Methyl-5-hepten-2-on (173)	989	986	ms, ri	-	-	-	o
unbekannt 115, 57, 42	1018			o	o	o	-
verzweigter Kohlenwasserstoff RI = 1025	1024			-	-	-	x
Benzylalkohol (117)	1033	1036	ms, ri	x	x	x	x
verzweigter Kohlenwasserstoff RI = 1033	1033			o	-	-	x
Verbindung N	1045			o	o	-	o
verzweigtes Alkan RI = 1053	1054			-	-	-	x
(E)-2-(Hydroxyimino)pentan-3-on (58)	1055	1051	ms, std	x	x	x	x
Verbindung X	1063			o	-	-	x
verzweigter Kohlenwasserstoff RI = 1075	1075			o	-	-	x
3-Ethyl-2,5-dimethylpyrazin (138)	1083	1082	ms, ri	o	o	o	o
Tetramethylpyrazin (139)	1086	1089	ms, ri	-	o	o	-
Benzoessäuremethylester (168)	1092	1094	ms, ri	o	o	o	-
Phenylethylalkohol (107)	1111	1116	ms, ri	xx	xx	xx	xx
Tropon (191)	1151	1182	ms	-	-	-	o
2-Phenyl-1-propanol (80)	1170	1179	ms, ri	-	-	-	o
Phenyllessigsäuremethylester (88)	1175	1178	ms, ri	o	o	o	x
Bernsteinsäurediethylester (192)	1182	1182	ms, ri	o	-	-	x
δ-Heptalacton (127)	1184		ms	o	o	o	-
unbekannt 87, 45, 42	1189			-	-	-	o
N-Phenylformamid	1211	1221	ms, ri	o	o	o	-
Cyclohexylisothiocyanat (55)	1228	1234	ms, std	-	-	-	o
Chinolin (185)	1231	1237	ms, ri	o	o	o	o
unbekannter Alkohol RI = 1235	1237			-	-	-	o
δ-Lacton RI = 1244	1247			-	-	-	o
p-Methoxybenzylalkohol (193)	1280	1290	ms, ri	-	-	-	o
δ-Octalacton (129)	1281	1288	ms, ri	-	o	o	o
Salinilacton D (19)	1285	1285	ms, std	o	o	-	o
2-Methylchinolin (184)	1300	1311	ms, ri	x	x	x	o
Salinilacton E (20)	1315	1315	ms, std	-	-	-	o
Geraniumsäuremethylester (137)	1323	1324	ms, ri	-	o	o	-
unbekannt 181, 163, 105, 91, 75	1327			-	-	-	o
Propansäure-2-phenylethylester (194)	1350	1350	ms, ri	o	o	o	o
unbekannt 150, 107, 81, 43	1357			-	-	-	o
Salinilacton F (21)	1368	1368	ms, std	o	o	o	o
2-Dodecanon	1394	1396	ms, ri	-	-	-	o
Salinilacton A (16)	1409	1410	ms, std	o	o	o	o
Salinilacton B (17)	1467	1468	ms, std	o	o	o	o
β-Ionon (122)	1484	1486	ms, ri	o	o	o	o
Tridecanal (188)	1510	1512	ms, ri	-	-	-	o
cis-Calamenen (195)	1522	1523	ms, ri	-	-	-	o
Salinilacton C (18)	1529	1527	ms, std	-	-	-	o
trans-Calamenen (196)	1531	1529	ms, ri	-	-	-	o
3-Methylpentadecan (198)	1571	1570	ms, ri	-	-	-	o
1-Tridecanol (123)	1575	1577	ms, ri	-	-	-	o
Verbindung W	1583			-	-	-	o

Terpenoid RI = 1611	1613		-	-	-	o
Cadalen (197)	1686	ms	-	-	-	o
Sesquiterpen RI = 1690	1690		-	-	-	o
verzweigter Kohlenwasserstoff RI = 1707	1707		-	-	-	o
3-Methylheptadecan (199)	1770	1770 ms, ri	-	-	-	o
unbekannt 192, 134, 93, 43	1793		-	-	-	o
Diterpen 272, 229, 159, 145	1807		-	o	o	-
Diterpen 272, 229, 173, 159, 145	1828		-	o	o	-
unbekannt 242, 132, 119, 95	1846		-	o	o	-

^adie angegebenen Werte sind Durchschnittswerte aller Messungen, ^bentnommen aus NIST Chemistry WebBook oder unserer eigenen Datenbank, ^cIdentifizierung der Verbindung beruht auf Vergleich des Massenspektrums mit Datenbank Spektrum (ms), Vergleich des Retentionsindex mit Literaturwerten gemessen auf einer gleichartigen Fused-Silica-Kapillarsäule (ri) und/oder direkter Vergleich mit einer synthetischen oder kommerziell erhältlichen Referenz-Verbindung (std), ^dstarke Peakverbreiterung, RI konnte nicht genau bestimmt werden

3.2.11. *Salinispora oceanensis* (CNT-403)

Der untersuchte Bakterienstamm gehört ebenfalls zur neuen Spezies *S. oceanensis* und wurde erstmals auf den Fiji-Inseln isoliert und besitzt eine intensive orangene Farbe.^[36] In den Gasphasenextrakten wurden viele unbekannte Verbindungen identifiziert.

Als Hauptkomponenten kommen die Alkohole 2-Cyclohexene-1-methanol (**12**), **107**, **117**, sowie die unbekannte Verbindung **Y** vor (Abbildung 46). Weiterhin konnten einige bekannte Verbindungen wie das Oxim **58**, die Hydroxyketone **7**, **47**, **96**, **108** und die Salinilactone **16-21** nachgewiesen werden. Erstmals in dieser Arbeit wurden die Ketone 5-Methyl-3-hexen-2-on (**200**) und 1-Phenyl-1,2-propandion (**201**) gefunden. Das Diketon **201** ist aus verschiedenen Bakterien wie *Loktanella* sp. und *Burkholderia ambifaria* bekannt.^[4,108] **200** hingegen konnte in dem Gram-negativen Bakterium *Shewanella algae* YM8 nachgewiesen werden.^[109] Weiterhin konnten die schwefelhaltigen Verbindungen Propansäure-S-methylthioester (**202**), 2,3,4-Trimethylthiophen (**203**) und **55** identifiziert werden. Einige S-Methyl Thioester sind bereits aus anderen *Salinispora* Bakterien aus dieser Arbeit bekannt. Thiophene hingegen sind seltener zu finden. Einige Methylthiophene werden von dem Darmbakterium *Clostridioides difficile* produziert.^[110] Die gefundene Verbindung **203** ist bisher jedoch nicht bekannt. Das Isothiocyanat **55** wurde hier erstmals im CLSA-Extrakt beobachtet, kommt aber auch als flüchtige Verbindung in *S. arenicola* CNS-205 und *S. cortesiana* CNY-202 vor (Abbildung 48).

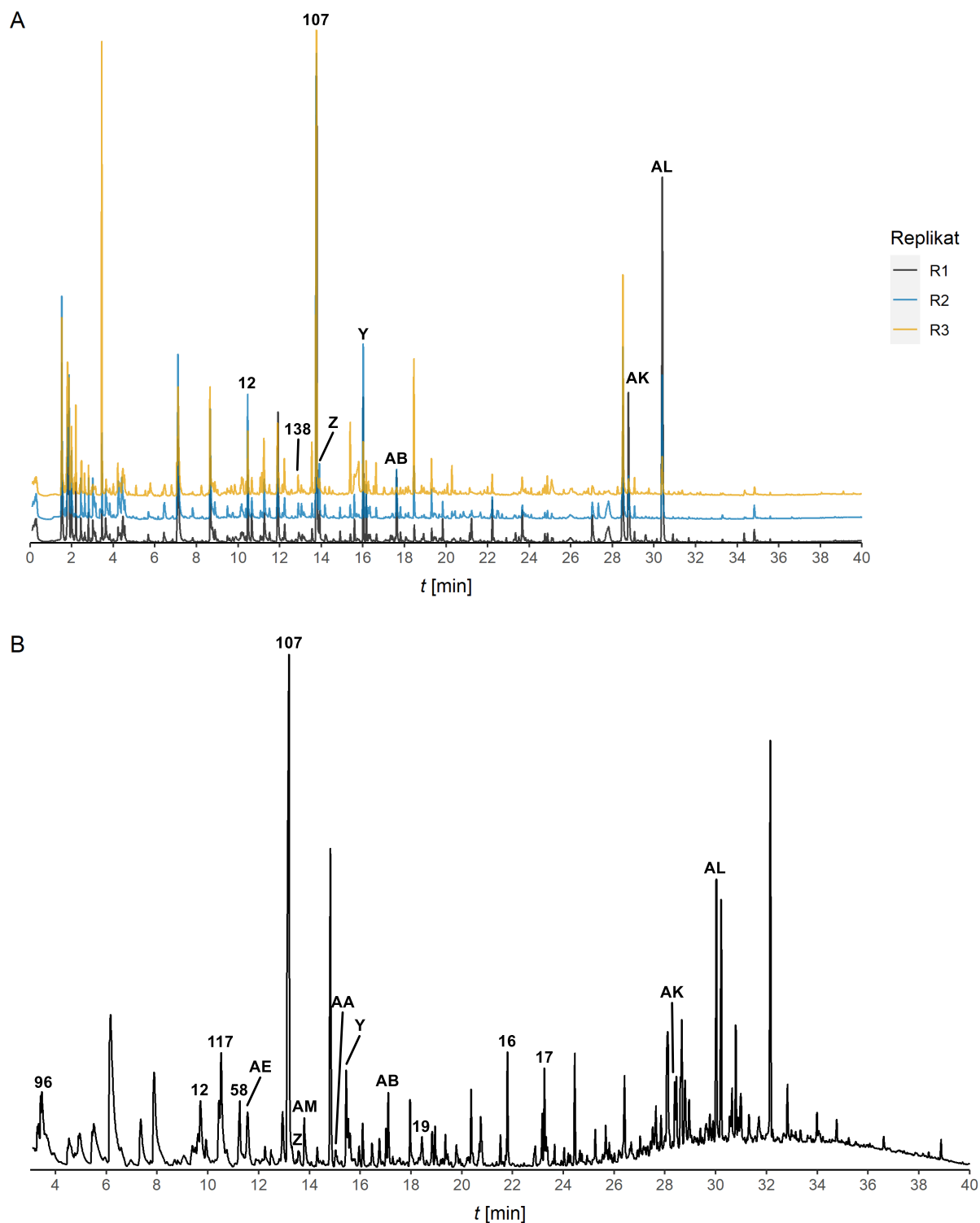
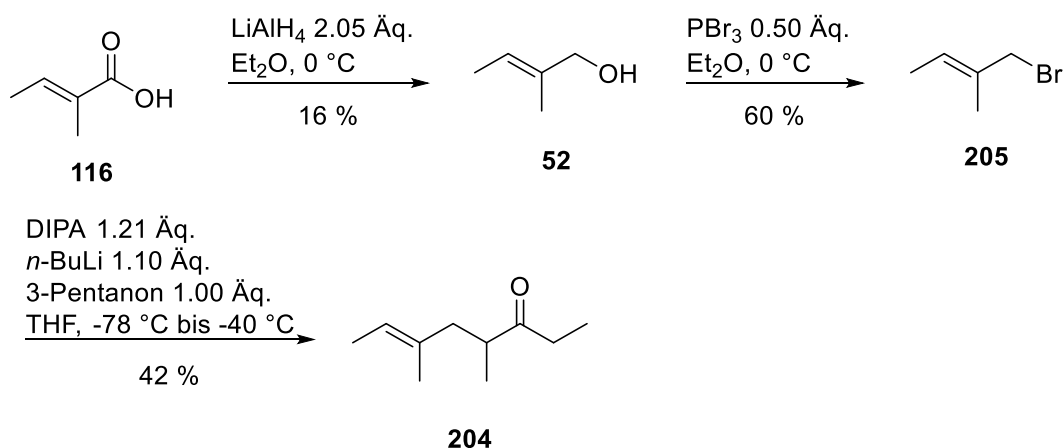


Abbildung 46: Totalionenstromchromatogramme der OSSA (A) und CLSA (B) aus *S. oceanensis* CNT-403.

Der Großteil der im Duftprofil vorkommenden Komponenten ist unbekannt. Die Verbindung **Z** besitzt die charakteristischen Fragmente $[M-29]^+$ und $[M-57]^+$ eines Ethylketons. Weiterhin wurden die Ionen $m/z = 69, 86$ einer McLafferty-Umlagerung und dem verbleibenden Alkylrest zugeordnet. Damit muss die Verbindung eine Methylverzweigung in α -Position zum Keton besitzen. Durch HRMS wurde die

Summenformel $C_{10}H_{18}O$ (gemessen 154.14379, berechnet 154.13576) bestimmt. Aus dem Massenspektrum wurde (*E*)-4,6-Dimethyloct-6-en-3-on (**204**) als Strukturvorschlag abgeleitet und ausgehend von Tiglinsäure (**116**) synthetisiert (Schema 8). **116** wurde mit Hilfe von $LiAlH_4$ zum Alkohol **52** reduziert und anschließend in einer Substitutions-Reaktion mit Phosphortribromid in das Bromid **205** umgewandelt. Im letzten Schritt wurde 3-Pentanon mit Lithiumdiisopropylamin (LDA) deprotoniert und mit **205** zum Keton **204** umgesetzt. Das Massenspektrum und der RI der synthetischen Verbindung stimmen mit dem der natürlich vorkommenden überein (Abbildung 47). **204** wurde bisher noch nicht als Naturstoff beschrieben. Die Aufklärung der Stereochemie steht noch aus. Ähnliche Verbindungen sind bereits aus Bakterien und Pilzen bekannt.^[50,111]



Schema 8: Synthese (*E*)-4,6-Dimethyloct-6-en-3-on (**204**) als unbekannte Verbindung **Z**.

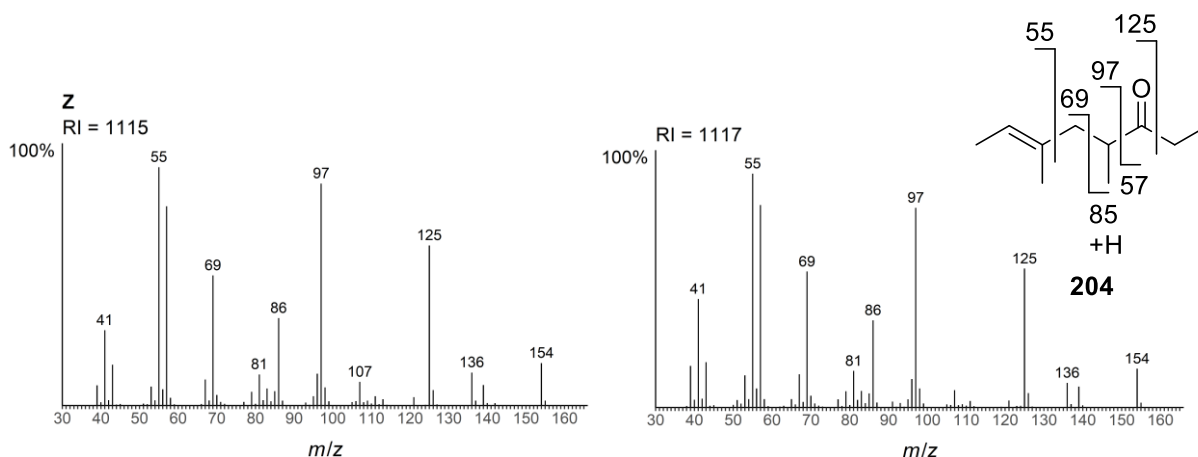


Abbildung 47: Massenspektren der natürlich vorkommenden Verbindung **Z** (links) und des synthetischen Ketons **204** (rechts).

Die Massenspektren vieler der unbekannten Metabolite weisen eine große Ähnlichkeit untereinander auf, sodass von einem gemeinsamen Strukturmotiv ausgegangen werden kann (Abbildung 49 & Abbildung 50). In allen Massenspektren der Verbindungen **AA**, **AB**, **AC** und **AD** existiert das Haupt-Ion $m/z = 137$. Der Molpeak hingegen ist nicht eindeutig zu bestimmen. Das Molekül-Ion von Verbindung **AA** und **AB** könnte bei $m/z = 152$ und das von **AC** und **AD** bei $m/z = 166$ liegen, was einer zusätzlichen CH_2 -Gruppe entspricht. Bei **AA** oder **AB** könnte es sich, basierend auf den Fragment-Ionen, um zweifach ungesättigten Varianten der neu identifizierten Verbindung **204** handeln. Eine HRMS-Messung könnte hier weitere Informationen zur Strukturaufklärung liefern. Allerdings kommen alle Metabolite nur in geringen Mengen in den CLSA-Extrakten vor, sodass die Aufnahme weiterer analytischer Daten erschwert ist. **AE** und **AF** besitzen zwar das gleiche Massenspektrum, unterscheiden sich in ihrem Retentionsindex aber um etwa 90. **AF** muss daher ein Kohlenstoffatom mehr besitzen. Aufgrund der intensiven Ionen $m/z = 107, 135, 150$ handelt es sich sehr wahrscheinlich um ein zyklisches Methylketon.

Auch die Massenspektren der unbekannten VOCs **AG** und **AH** sind fast identisch. So zeigen beide die Ionen $m/z = 40, 69, 97, 167$. Ein Strukturvorschlag konnte anhand der vorliegenden Daten nicht gemacht werden. Da beide Verbindungen vornehmlich in den OSSA Replikaten gefunden wurden, war die Aufnahme weiterer analytischer Daten mittels IR-Spektroskopie oder HRMS nicht möglich.

Weiterhin weisen die vier Massenspektren von **AI** – **AL** ein gemeinsames Fragment $m/z = 211$ auf. Zudem sind die Massenspektren von **AI** und **AK**, sowie **AJ** und **AL** identisch und unterscheiden sich in ihrem RI um eine CH_2 -Einheit. **AL** kommt in größeren Mengen vor, sodass hier die Möglichkeit besteht, zukünftig mehr Informationen durch HRMS oder IR zu erhalten.

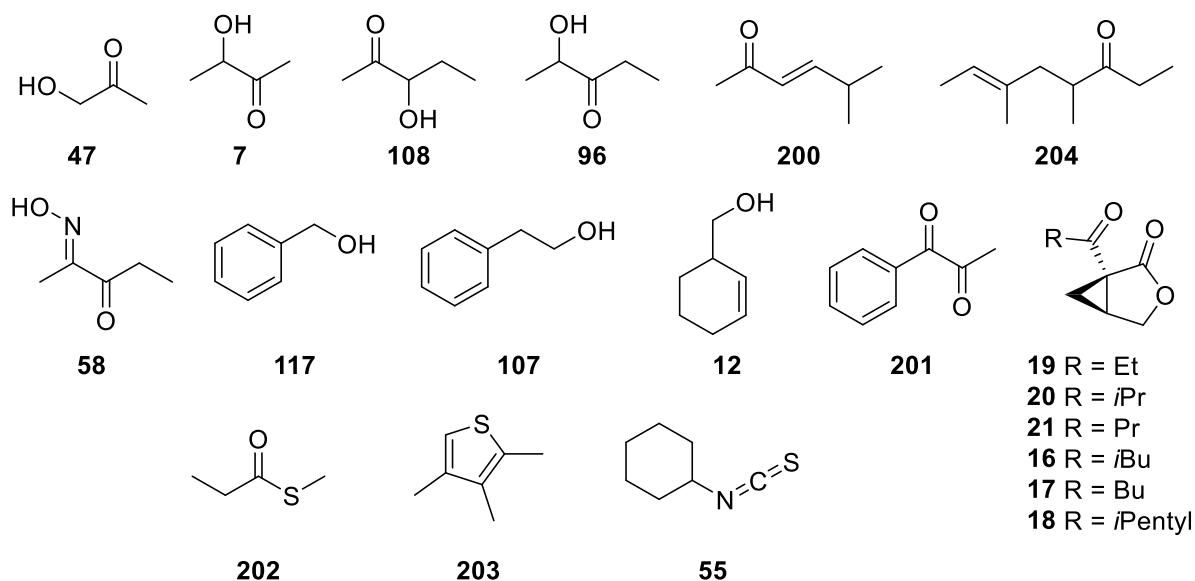


Abbildung 48: Strukturen flüchtiger Substanzen aus *S. oceanensis* CNT-403.

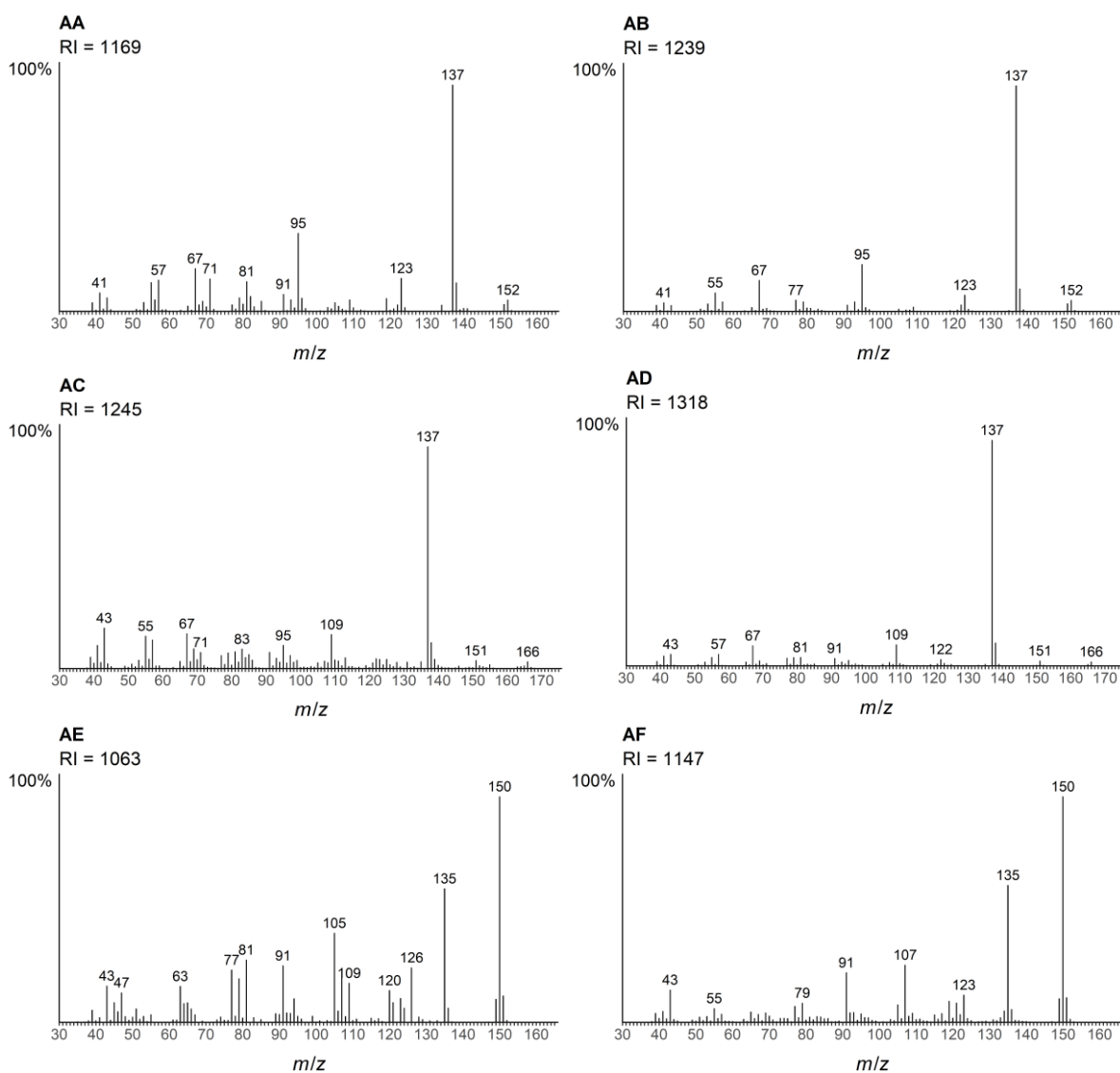


Abbildung 49: Massenspektren der unbekannten Verbindungen **AA-AF** aus CNT-403.

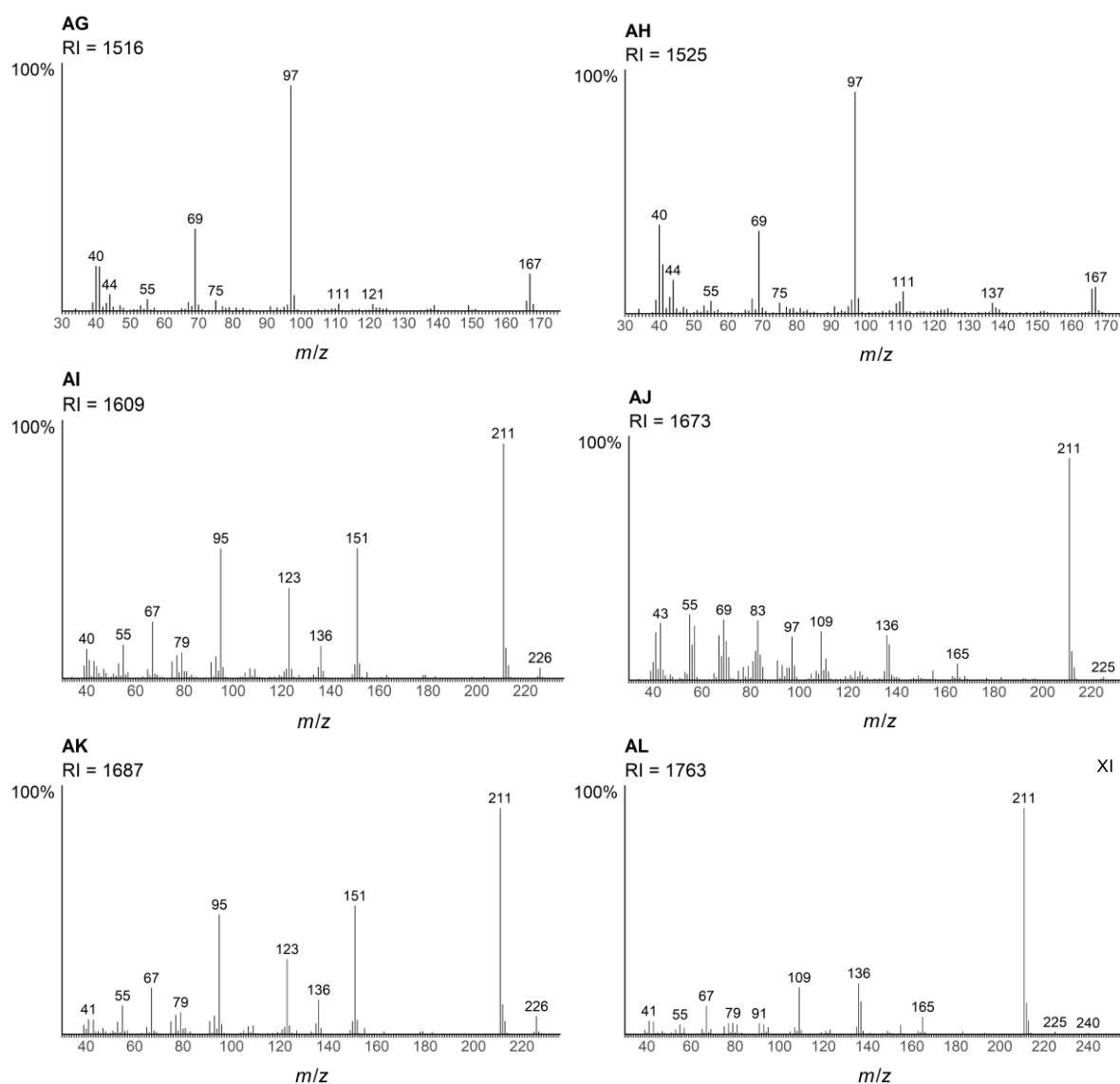
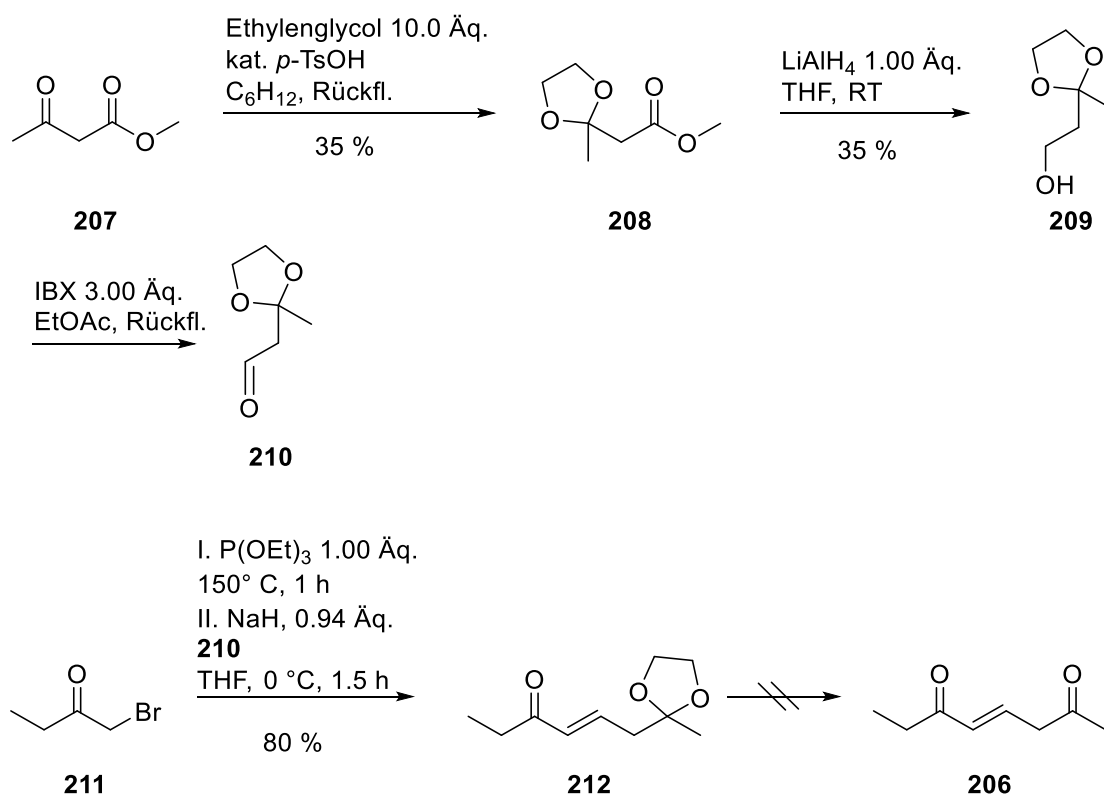


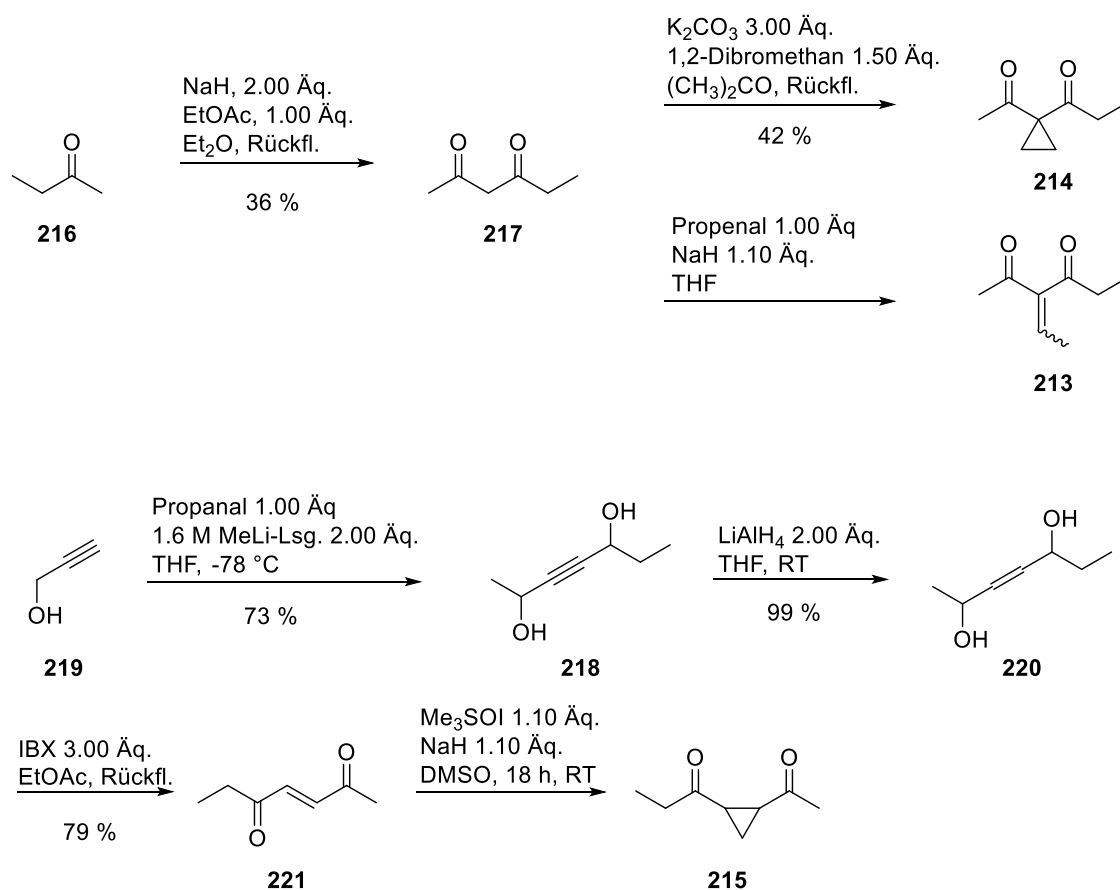
Abbildung 50: Massenspektren der unbekannten Verbindungen **AG-AL** aus CNT-403.

Die Verbindung **AM** besitzt einen relativ hohen Molpeak mit $m/z = 140$ und zeigt mit den Ionen $m/z = 43, 57$ die typischen Fragmente eines Ethyl- und Methylketons. Die Summenformel wurde mit Hilfe von HRMS zu $C_8H_{12}O_2$ bestimmt. Somit muss neben den zwei Carbonylgruppen noch eine weitere Unsat tigung im Molekül vorhanden sein, die durch eine Doppelbindung oder einen Zyklus zustande kommt. Daraufhin wurde 4-Octen-2,6-dion (**206**) als mögliche Struktur vorgeschlagen und sollte ausgehend von Methylacetoacetat (**207**) synthetisiert werden (Schema 9). Im ersten Schritt wurde die Ketogruppe mit Ethylenglycol als Acetal gesch tzt (**208**). Als nächstes erfolgte die Reduktion der Esterfunktionalit t zum Alkohol **209** mit Hilfe von $LiAlH_4$. Im Anschluss wurde dann wieder mit IBX zum Aldehyd **210** oxidiert. Das Bromid **211** wurde dann in einer HWE-Reaktion zusammen mit **210** zum α,β -ungesättigten Keton **212** umgesetzt. Die Abspaltung der Schutzgruppe im letzten Schritt durch die Zugabe von wässriger

Säure war leider nicht erfolgreich. Es konnten nur Zyklisierungsprodukte beobachtet werden, die nicht näher bestimmt wurden. Aufgrund der Doppelbindungsposition und der Tendenz von **206**, δ -Lactole zu bilden, wurde der Strukturvorschlag verworfen. Weitere Überlegungen führten zu den drei Verbindungen 3-Ethylidenhexan-2,4-dion (**213**), 1-(1-Acetylcyclopropyl)-propan-1-on (**214**) und 1-(2-Acetylcyclopropyl)propan-1-on (**215**). **213** und **214** wurden ausgehend von 2-Butanon (**216**) synthetisiert (Schema 10). Das durch die Acylierung mit Ethylacetat erhaltene β -Diketon **217** wurde anschließend mit 1,2-Dibromethan zum Cyclopropan^[112] **214** bzw. in einer KNOEVENAGEL-Reaktion^[113] mit Propanal zu **213** umgesetzt. Die Synthese zu **215** basierte auf der Arbeit von SKATTEBØL *et al.*^[114] Im ersten Schritt wurde das Acetylendiol **218** durch die Deprotonierung des Alkins **219** und anschließender Zugabe von Propanal hergestellt. Im Anschluss erfolgte eine Reduktion mit LiAlH_4 zum olefinischen Diol **220**, welches in einer weiteren Oxidation mit IBX zum Diketon **221** umgesetzt wurde. Durch eine Corey-Chaykovsky-Cyclopropanierung^[115] wurde im letzten Schritt **215** hergestellt. Die Massenspektren der hergestellten Verbindungen stimmen nicht mit dem des Naturstoffs überein. Allerdings liegen die gemessenen RIs nahe dem des Naturstoffs **AM** (Abbildung 51). Die Struktur konnte somit zwar nicht final bestimmt, aber drei Strukturen definitiv ausgeschlossen werden.



Schema 9: Synthese des Ketons **206** als möglicher Strukturvorschlag für die unbekannte Verbindung **AM**.



Schema 10: Reaktionsübersicht zur Synthese von **213-215** zur Bestimmung der unbekannten Verbindung **AM**.

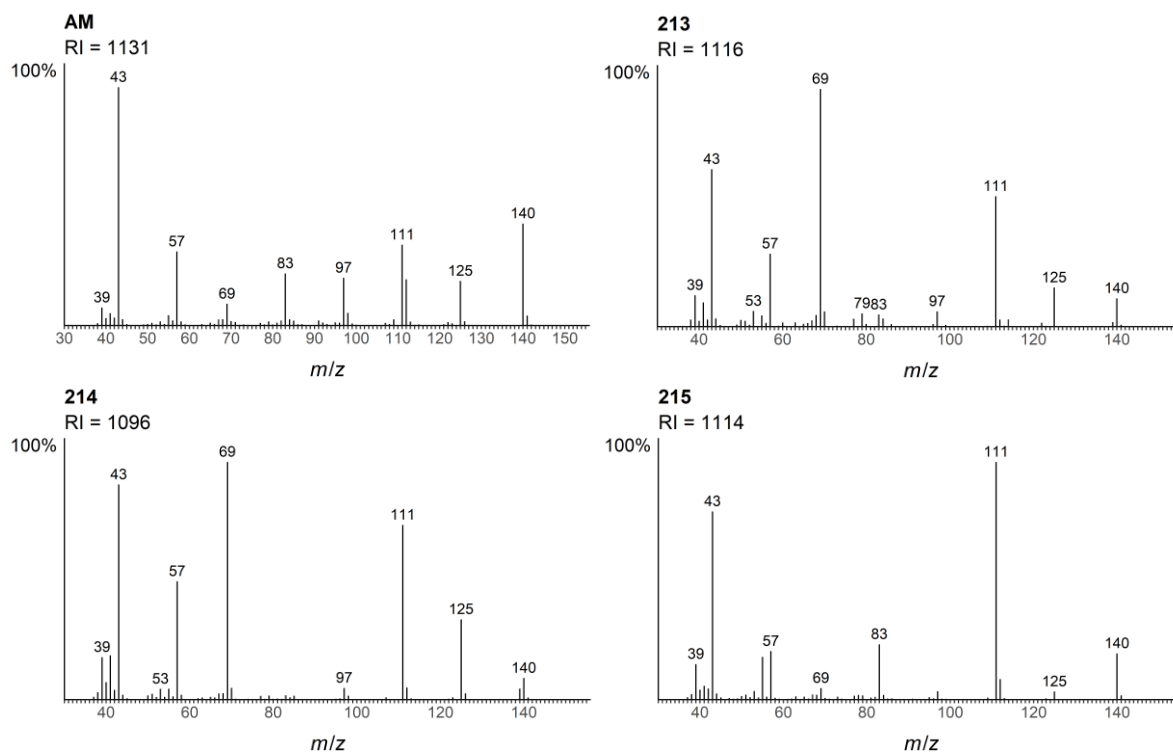


Abbildung 51: Massenspektren der natürlich vorkommenden Verbindung **AM** und der synthetisch hergestellten Verbindungen **213-215**.

Als eine der Hauptkomponenten im Duftprofil war die Aufklärung der Verbindung **Y** von besonderem Interesse. Das Massenspektrum weist ein Molekül-Ion mit $m/z = 166$ und der Summenformel $C_{11}H_{18}O$ (gemessen 166.13563, berechnet 166.13576) auf. Die Fragment-Ionen $m/z = 123$, 137, 151 sind auf die Spaltung von Alkylgruppen zurückzuführen. Weiterhin besitzt die Verbindung drei Unsatigungen. Durch die Aufnahme eines IR-Spektrums konnte gezeigt werden, dass die Verbindung keine Carbonylfunktionalität besitzt. Dafür zeigt das Spektrum Banden bei 1656 cm^{-1} bzw. 1629 cm^{-1} , die von zwei konjugierten Doppelbindungen stammen könnten, sowie eine Bande bei 1137 cm^{-1} , die charakteristisch für eine Ether-Bindung ist.^[52] Die dritte Unsatigung entspringt sehr wahrscheinlich aus einem Kohlenstoffzyklus. Dafür spricht das Fragment-Ion $m/z = 108$ mit der Summenformel C_8H_{12} , welches aus einer McLAFFERTY-Umlagerung zu stammen scheint, als auch die hohe Intensität des Molekül-Ions.^[51] Mit den vorliegenden Daten kommen mehrere Strukturvorschläge in Frage (Abbildung 52). Um die Anzahl möglicher Strukturen einzudämmen und den synthetischen Aufwand zu reduzieren, könnten DFT-Berechnungen („*Density Functional Theory*“) des IR-Spektrums den Pool an Strukturvorschlägen eingrenzen.^[42]

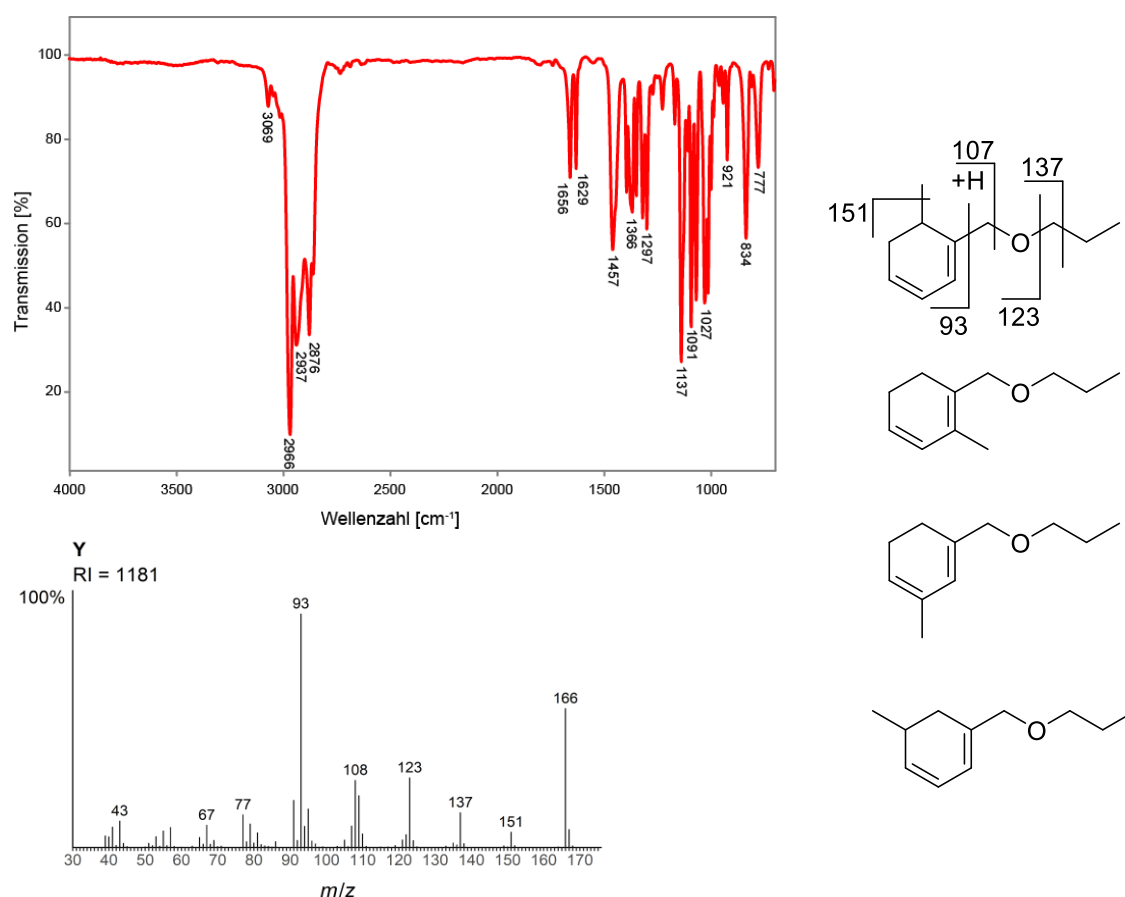


Abbildung 52: Massen- und IR-Spektrum der unbekannten Verbindungen **Y** und vier mögliche Strukturvorschläge.

Tabelle 10: Flüchtige Verbindungen aus den Gasphasenextrakten von *S. oceanensis* CNT-403. Die Intensitäten der einzelnen Verbindungen werden mit 0-1% (o), 1-10% (x), 10-30% (xx), 30-100% (xxx) relativ zur Gesamtpeakfläche des Totalionenstromchromatogramms angegeben.

Verbindung	RI _{exp} ^a	RI _{lit} ^b	Ident. ^c	OSSA 1 (THG231)	OSSA 2 (THG232)	OSSA 3 (THG233)	CLSA (THG179)
1-Butanol (90)	670	659	ms, ri	x	x	-	-
2,3-Pentandion (49)	700	698	ms, ri	o	o	o	-
1-Hydroxy-2-propanon (47)	713	665	ms	o	x	o	-
3-Methyl-3-buten-1-ol (51)	727	730	ms, ri	o	x	o	-
Acetoin (7)	736	713	ms	o	o	o	-
unbekannt 83, 55, 42	759			o	o	o	-
Prenol (50)	770	775	ms, ri	o	o	-	-
unbekannt 100, 84, 58, 55, 43	784			o	o	o	-
Propansäure-S-methylthioester (202)	793	785	ms, ri	o	o	o	-
3-Hydroxy-2-pentanon (108)	808		ms	-	o	o	-
2-Hydroxy-3-pentanon (96)	814	821	ms, ri	o	o	o	-
2-Ethyl-2-pentenal (187)	825	837	ms, ri	-	o	o	-
Verbindung M	832		ms	-	o	-	o
5-Methyl-hexen-2-on (200)	875	875	ms, ri	o	o	-	-
3-Heptanon (110)	883	887	ms, ri	-	o	o	-
Pentansäureethylester (148)	901	900	ms, ri	o	o	-	-
unbekannt 112, 83, 55	931			o	o	o	o
3-Methylbutanolid (57)	953		ms	o	-	o	o
unbekanntes Keton M128	961			o	o	o	-
2,3,4-Trimethylthiophen (203)	979			o	o	o	o
4-Methyl-3-pentensäure (83)	982	1011	ms	o	o	o	o
2-Cyclohexene-1-methanol (12)	1008	1011	ms, ri	x	x	x	x
Benzylalkohol (117)	1032	1036	ms, ri	x	x	x	x
unbekannt 140, 125, 97, 69, 41	1036			-	-	-	o
(E)-2-(Hydroxyimino)pentan-3-on (58)	1052	1051	ms, std	x	x	x	x
unbekannt 142, 113, 71, 57, 43	1054			o	-	o	-
unbekanntes Thiophen 140, 125	1059			o	o	o	o
Verbindung AE	1063			o	o	-	x
3-Ethyl-2,5-dimethylpyrazin (138)	1082	1082	ms, ri	-	o	o	o
Tetramethylpyrazin (139)	1085	1089	ms, ri	o	o	o	-
unbekannt 71, 57, 44	1087			o	o	-	-
unbekannt 138, 123	1091			o	o	o	o
Phenylethylalkohol (107)	1110	1116	ms, ri	xx	xx	xx	xx
Verbindung Z , (E)-4,6-dimethyloct-6-en-3-on (204)	1115	1117	ms, std	o	x	o	o
2-Cyclohexene-1-ethanol (13)	1124	1120	ms, ri	-	-	-	o
1-Phenyl-2-propanon (158)	1125	1124	ms, ri	o	o	o	-
Verbindung AM	1131			-	-	o	x
Camphor	1140	1145	ms, ri	-	-	-	o
Verbindung AF	1147			o	o	-	o
γ-Heptalacton (126)	1151	1159	ms, ri	-	-	-	o
1-Phenyl-1,2-propandion (201)	1166	1175	ms, ri	-	-	-	o
Verbindung AA	1169			o	o	o	o
Verbindung Y	1183			x	x	x	x
unbekannt 192, 177, 163, 135, 119	1188			o	o	o	o
unbekannt 148, 121	1191			o	o	o	-
Ethylketon RI = 1194	1194			o	o	o	o
verzweigter Kohlenwasserstoff RI = 1214	1214			-	-	-	o
Cyclohexylisothiocyanat (55)	1228	1234	ms, std	-	-	-	o
unbekannt 152, 139, 109	1231			o	o	o	o
unbekannter Alkohol RI = 1235	1237			o	-	-	o
Verbindung AB	1239			x	x	o	o
Verbindung AC	1245			o	o	o	o
unbekannt 138, 123, 109	1258			-	o	o	-
unbekannt 154, 125, 96, 67	1269			o	x	x	o
unbekannt 154, 136, 125, 108, 83	1285			-	o	o	-
Salinilacton D (19)	1285	1285	ms, std	o	-	-	o

unbekanntes Keton	1298			o	o	o	o
unbekannt 166, 151, 138, 123, 112, 83, 55, 43	1303			o	o	o	o
unbekannt 192, 135, 109, 91	1312			o	o	o	o
Salinilacton E (20)	1314	1315	ms, std	o	-	o	o
Verbindung AD	1318			o	o	o	o
unbekannt 180, 151, 109	1327			-	o	o	o
γ -Nonalacton (166)	1360			-	-	-	o
Salinilacton F (21)	1368	1368	ms, std	o	o	o	o
unbekannt 170, 123, 95, 67	1371			o	o	o	o
1-Undecanol (183)	1373	1371	ms, ri	o	-	-	o
2-Dodecanon	1394	1396	ms, ri	-	-	-	o
Salinilacton A (16)	1409	1410	ms, std	o	o	o	x
unbekannt 184, 137, 109, 67	1412			o	o	-	-
unbekannt 184, 155, 137, 109, 67	1454			o	o	-	o
unbekannt 152, 97, 69	1460			o	o	o	-
Salinilacton B (17)	1467	1468	ms, std	o	o	o	o
β -Ionon (122)	1484	1486	ms, ri	-	-	-	o
2-Tridecanon	1496			-	-	-	o
Tridecanal (188)	1510	1512	ms, ri	-	-	-	o
Verbindung AG	1516			o	o	-	-
unbekannt 167, 149, 121	1517			-	-	o	x
Verbindung AH	1525			o	o	o	o
Salinilacton C (18)	1528	1527	ms, std	o	-	-	o
unbekannt 167, 139, 125, 111	1569			-	-	-	o
3-Methylpentadecan (198)	1571	1570	ms, ri	-	-	-	o
Verbindung W	1583			-	-	-	o
Verbindung AI	1609			o	o	o	o
unbekannt 192, 177, 149	1622			-	o	-	o
unbekannt 160, 138, 111, 69	1644			x	x	o	-
Verbindung AJ	1673			o	o	o	o
Verbindung AK	1687			x	o	o	o
unbekannt 227, 181, 137, 109 RI 1692	1692			-	-	-	o
verzweigter Kohlenwasserstoff RI = 1707	1707			-	-	-	x
unbekannt 240, 225, 165, 123, 95	1751			o	-	-	o
Verbindung AL	1763			xx	x	o	x
unbekannt 227, 181, 137, 109 RI = 1771	1771			-	-	-	x
unbekannt 254, 239, 179, 109 RI = 1787	1787			o	o	-	o
unbekannt 254, 239, 179, 109 RI = 1794	1794			-	-	-	o

^adie angegebenen Werte sind Durchschnittswerte aller Messungen, ^bentnommen aus NIST Chemistry WebBook oder unserer eigenen Datenbank, ^cIdentifizierung der Verbindung beruht auf Vergleich des Massenspektrums mit Datenbank Spektrum (ms), Vergleich des Retentionsindex mit Literaturwerten gemessen auf einer gleichartigen Fused-Silica-Kapillarsäule (ri) und/oder direkter Vergleich mit einer synthetischen oder kommerziell erhältlichen Referenz-Verbindung (std)

3.2.12. *Salinispora oceanensis* (CNT-854)

Bei *S. oceanensis* CNT-854 handelt es sich um einen weiteren Vertreter der Gattung *S. oceanensis*, der erstmals aus marinen Sedimenten nahe Hawaii isoliert wurde.^[36] Im TIC des CLSA-Extrakts dominieren neben Phenylethylalkohol (**107**) und dem Ester **88** vor allem die beiden Säuren **113** und **114** (Abbildung 53). Aufgrund der stark verbreiterten Peaks konnten die RIs nicht korrekt bestimmt werden. In den Replikaten der OSSA hingegen machen hauptsächlich das Pyrazin **144** und der Alkohol **107** den Großteil der volatilen Verbindungen aus. Daneben konnten noch Benzylalkohol (**117**) und das Oxim **58** in größeren Mengen gefunden werden. Zusätzlich konnten die drei Säuren 2-Ethylhexansäure (**222**), Phenylelessigsäure (**223**) und Nonansäure (**84**) identifiziert werden. **222** ist sehr wahrscheinlich ein Artefakt, welches durch Oxidation des aus dem Weichmacher Diethylhexylphthalat stammenden 2-Ethyl-1-hexanol entsteht. **223** und **84** sind Oxidationsprodukte der Hauptkomponente **107** und des aus dem Medium stammenden Nonanal. Beide Verbindungen sind wahrscheinlich nicht bakteriellen Ursprungs. Weiterhin werden die bereits bekannten Hydroxyketone **7**, **47**, **96** und **108**, verschiedene Alkohole wie **90**, **132**, 2-Methyl-6-methylen-2-octanol (**224**), **77** und **123**, sowie die Ketone **49**, **110**, **158**, **175** und 2-Undecanon (**225**) vom Bakterium produziert. **224** ist bisher nicht als Naturstoff bekannt. In geringen Mengen kommen die bekannten Salinilactone **16**, **17**, **19**, **21** und einige aromatische Kohlenwasserstoffe wie **79**, **133**, **134** und Cymol vor. In den Analysen konnten weiterhin einige N-haltige Verbindungen gefunden werden. Dazu zählen neben **144** das Pyrazin **138**, 2-Acetylannilin (**75**), das Isothiocyanat **55**, sowie die Chinoline **184** und **185** (Abbildung 54). Zusätzlich wurden noch einige Lactone, Ester und verzweigte Kohlenwasserstoffe neben einigen unbekannten Substanzen gefunden. Die Verbindungen **G**, **H**, **N** und **W** konnten bereits in anderen *Salinispora*-Bakterien dieser Arbeit identifiziert werden.

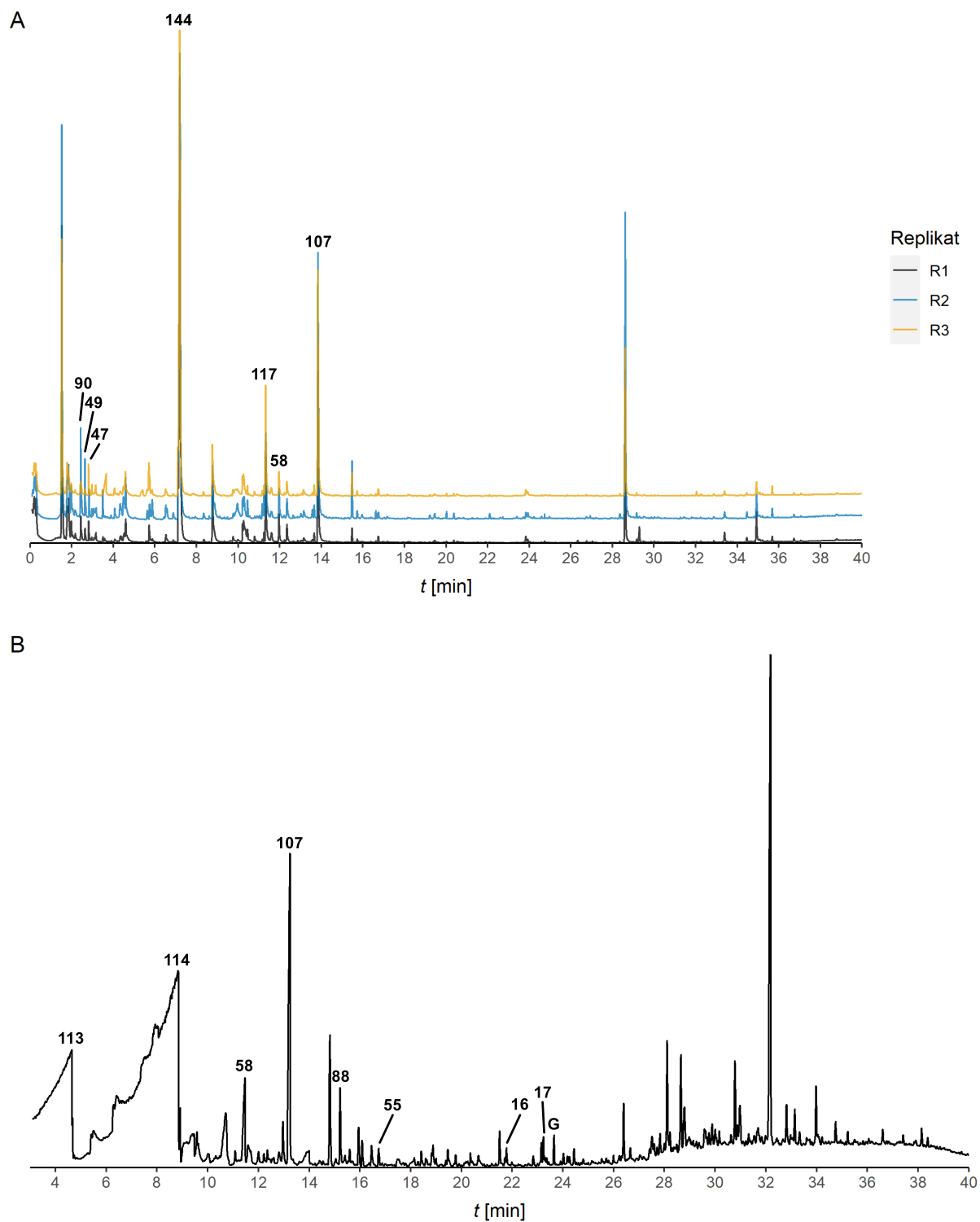


Abbildung 53: Totalionenstromchromatogramme der OSSA (A) und CLSA (B) aus *S. oceanensis* CNT-854.

Tabelle 11: Flüchtige Verbindungen aus den Gasphasenextrakten von *S. oceanensis* CNT-854. Die Intensitäten der einzelnen Verbindungen werden mit 0-1% (o), 1-10% (x), 10-30% (xx), 30-100% (xxx) relativ zur Gesamtpeakfläche des Totalionenstromchromatogramms angegeben.

Verbindung	RI _{exp} ^a	RI _{lit} ^b	Ident. ^c	OSSA 1 (THG212)	OSSA 2 (THG213)	OSSA 3 (THG214)	CLSA (THG184)
1-Butanol (90)	669	659	ms, ri	x	x	o	-
2,3-Pentandion (49)	702	698	ms, ri	o	x	o	-
1-Hydroxy-2-propanon (47)	715	665	ms	x	x	-	-
Acetoin (7)	737	713	ms	o	o	o	-
unbekannt 100, 84, 58, 55, 43	786			o	o	-	-
3-Hydroxy-2-pentanon (108)	809		ms	o	o	o	-
2-Hydroxy-3-pentanon (96)	814	821	ms, ri	o	x	o	o
2-Methylpropansäure (113)	857 ^d	774	ms	-	-	-	xx
3-Heptanon (110)	884	887	ms, ri	-	o	o	-
o-Xylol (133)	890	887	ms, ri	o	o	o	o
2,5-Dimethylpyrazin (144)	910	917	ms, ri	xxx	xx	xx	-
Propylbenzol (134)	951	953	ms, ri	-	o	o	-
1,3,5-Trimethylbenzol (79)	966	972	ms, ri	-	o	o	-
2-Methylbutansäure (114)	983 ^d	861	ms	-	-	-	xxx
Cymol	1023	1025	ms, ri	o	o	-	o
unbekannt 115, 57, 42	1031			-	-	-	o
Benzylalkohol (117)	1033	1036	ms, ri	x	x	x	x
Verbindung N	1049			-	-	-	o
(E)-2-(Hydroxyimino)pentan-3-on (58)	1054	1051	ms, std	x	x	x	x
α-Methylbenzylalkohol (132)	1060	1061	ms, ri	o	o	o	-
2-Methyl-6-methylene-2-octanol (224)	1072		ms	-	o	o	-
3-Ethyl-2,5-dimethylpyrazin (138)	1085	1082	ms, ri	o	o	-	o
Verbindung H	1088			o	o	-	-
3,5-Dimethyl-2-cyclohexen-1-on (175)	1099		ms	o	-	o	-
Phenylethylalkohol (107)	1110	1116	ms, ri	x	x	x	x
1-Phenyl-2-propanon (158)	1126	1124	ms, ri	o	o	o	-
2-Ethylhexansäure (222) ^e	1137	1123	ms, ri	-	-	-	o
γ-Heptalacton (126)	1150	1159	ms, ri	-	-	-	o
Menthol (77)	1171	1174	ms, ri	o	o	o	o
Phenyllessigsäuremethylester (88)	1177	1178	ms, ri	o	o	-	x
Bernsteinsäurediethylester (192)	1183	1182	ms, ri	-	-	-	o
unbekannt 87, 45, 42	1189			-	-	-	o
verzweigter Kohlenwasserstoff RI = 1214	1214			-	-	-	o
Cyclohexylisothiocyanat (55)	1227	1234	ms, std	-	-	-	o
Chinolin (185)	1233	1237	ms, ri	-	-	-	o
Phenyllessigsäure (223)	1254	1262	ms, ri	-	-	-	o
Nonansäure (84)	1276	1273	ms, ri	-	-	-	o
Salinilacton D (19)	1286	1285	ms, std	-	-	-	o
2-Undecanon (225)	1293	1294	ms, ri	-	-	-	o
2-Acetylanilin (75)	1297	1308	ms, ri	o	o	o	-
2-Methylchinolin (184)	1302	1311	ms, ri	-	-	-	o
Geraniumsäuremethylester (137)	1323	1324	ms, ri	-	-	-	o
unbekannt 181, 163, 105, 91, 75	1326			-	-	-	o
Propansäure-2-phenylethylester (194)	1351	1350	ms, ri	-	o	-	o
unbekannt 150, 107, 81, 43	1357			-	-	-	o
γ-Nonalacton (166)	1359	1363	ms, ri	-	-	-	o
Salinilacton F (21)	1368	1368	ms, std	-	-	-	o
Salinilacton A (16)	1410	1410	ms, std	-	-	-	o
Salinilacton B (17)	1468	1468	ms, std	-	-	-	o
Verbindung G	1485			-	o	-	o
Tridecanal (188)	1510	1512	ms, ri	-	-	-	o
unbekannt 170, 127, 98, 72, 45	1515			-	-	-	o
cis-Calamenen (195)	1532	1523	ms, ri	-	-	-	o
3-Methylpentadecan (198)	1571	1570	ms, ri	-	-	-	o
1-Tridecanol (123)	1574	1577	ms, ri	-	-	-	o
Verbindung W	1583			-	-	-	o
Methylester M = 240	1681			-	-	-	o

verzweigter Kohlenwasserstoff RI = 1707	1707	-	-	-	x
3-Methylheptadecan (199)	1770	1770	ms, ri	-	o
verzweigter Kohlenwasserstoff RI = 1808	1808	-	-	-	o

^adie angegebenen Werte sind Durchschnittswerte aller Messungen, ^bentnommen aus NIST Chemistry WebBook oder unserer eigenen Datenbank, ^cIdentifizierung der Verbindung beruht auf Vergleich des Massenspektrums mit Datenbank Spektrum (ms), Vergleich des Retentionsindex mit Literaturwerten gemessen auf einer gleichartigen Fused-Silica-Kapillarsäule (ri) und/oder direkter Vergleich mit einer synthetischen oder kommerziell erhältlichen Referenz-Verbindung (std), ^dstarke Peakverbreiterung, RI konnte nicht genau bestimmt werden, ^eArtefakt

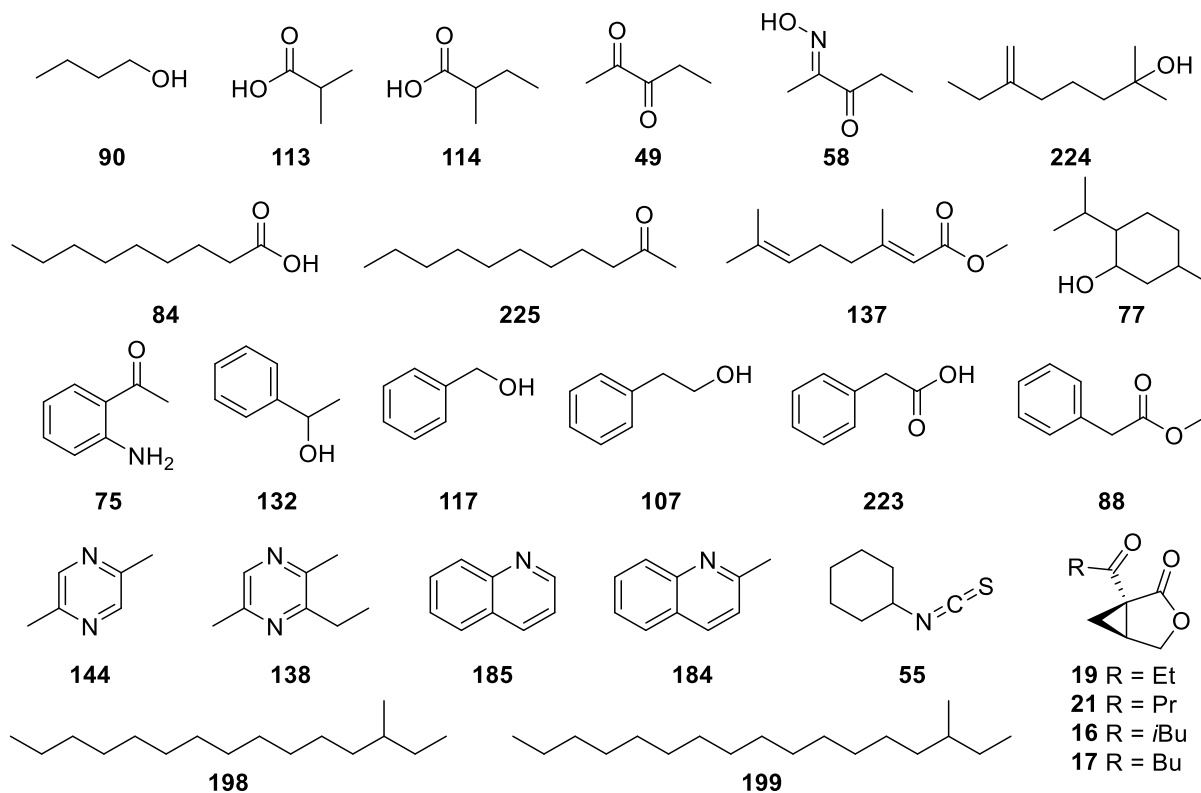


Abbildung 54: Strukturen flüchtiger Substanzen aus *S. oceanensis* CNT-854.

3.2.13. *Salinispora goodfellowii* (CNY-666)

S. goodfellowii CNY^T-666 wurde erstmals aus marinen Sedimenten von den Madeira Inseln isoliert.^[37] Es handelt sich um den Typenstamm der neuen Spezies *S. goodfellowii*, die nach Michael Goodfellow für seinen Beitrag zur Erforschung von Actinobakterien und der Beschreibung des Genus *Salinispora* benannt wurde.^[37] Im Duftprofil des Bakteriums konnten hauptsächlich bekannte Verbindungen gefunden werden. Erneut kommen das Pyrazin **144**, das Oxim **58** sowie der Alkohol **107** in großen Mengen vor. Neben Essigsäure (**226**), die hier das erste Mal in den Extrakten der OSSA nachgewiesen werden konnte, waren noch einige andere kurzkettige Säuren wie **113-116** vorhanden. **226** wird von vielen *Actinomyceten* und anderen Bakterien emittiert.^[4,116] Daneben kommen die beiden Ester **85** und Essigsäure-2-phenylethylester (**227**) in den Gasphasenextrakten vor und könnten durch Reaktion von **226** mit 1-Butanol (**90**) bzw. **107** entstanden sein. Ebenso könnte auch der Ester **194** aus der Reaktion von **107** mit Propansäure hervorgegangen sein, wobei letztere nicht im Gasphasenextrakt dieses Bakteriums identifiziert werden konnte. Die Alkohole **50, 51, 80, 90-92, 117, 132, 157** und Hydroxyketone **7, 96, 108, 131** sind bereits aus den anderen untersuchten *Salinispora*-Stämmen bekannt und dort diskutiert worden. Weiterhin konnten die Norcarotenoide **78, 122** und **143** gefunden werden. Auch einige Ketone (**49, 111, 136, 154**), Lactone und aromatischen Ester (**88, 147, 168**) traten in den Gasphasen-Analysen auf. Aufgrund des fehlenden *spt* Genclusters werden, wie auch schon in CNR-942, keine Salinilactone von CNY^T-666 produziert.^[43] Erstmals hingegen konnten die zwei Terpenoide Geosmin (**1**) und 2-Methylisoborneol (**228**) in sehr geringen Mengen als VOCs aus *Salinispora*-Bakterien nachgewiesen werden. Beide Verbindungen zählen zu den am weitesten verbreiteten Terpenoiden und besitzen einen muffig-erdigen Geruch. 2-Methyl-2-bornen (**229**) kann formal durch Dehydratisierung von **228** entstehen und könnte somit nicht direkt vom Bakterium produziert worden sein.^[4]

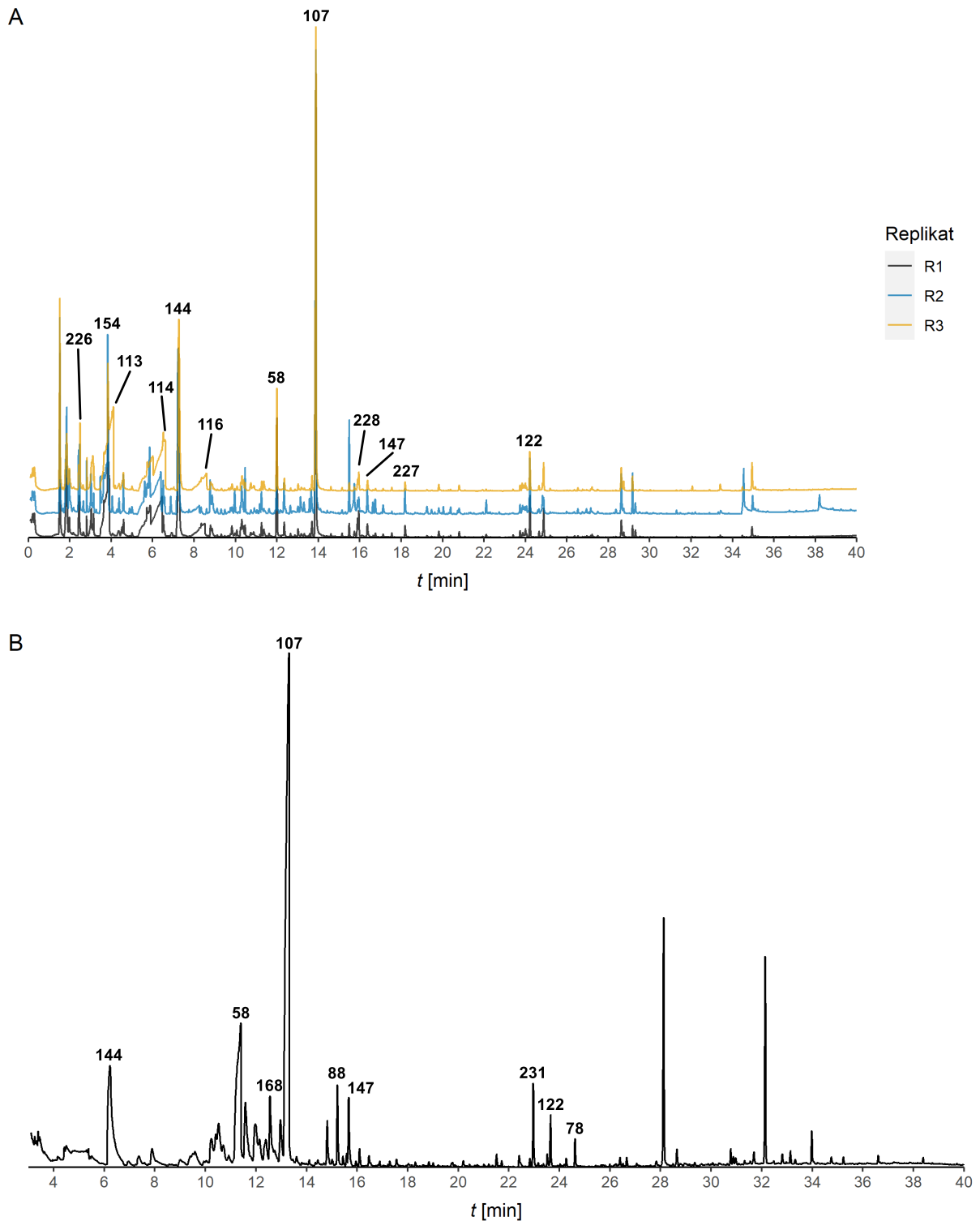


Abbildung 55: Totalionenstromchromatogramme der OSSA (A) und CLSA (B) aus *S. goodfellowii* CNY-666.

Neben **144** wurden noch weitere stickstoffhaltige Verbindungen gefunden. Dazu zählen die Pyrazine 2-Isopropyl-5-methylpyrazin (**230**) und **138**, sowie das Oxim **60** (Abbildung 57). Neben noch weiteren unbekannten Substanzen konnten auch hier **H**, **J**, **K**, **M**, **N** und **Q** gefunden werden. Im CLSA-Extrakt wurde eine größere Menge der bereits aus CNY-202 bekannten Verbindung **Q** beobachtet, sodass hier die Aufnahme

einer hochaufgelösten Masse gelang. Durch die so bestimmte Summenformel von $C_9H_{10}O_4$ (gemessen 182.05849, berechnet 182.05791) konnten die Datenbankvorschläge auf 2-Hydroxy-3-methoxybenzoesäuremethylester (**231**) und 3-Hydroxy-2-methoxy-benzoesäuremethylester eingegrenzt werden. Durch den Vergleich der Massenspektren und Retentionsindices mit einer kommerziell erworbenen Probe von **231** konnte dieser Vorschlag bestätigt werden (Abbildung 56). Die Verbindung ist bisher nicht als Naturstoff bekannt und wurde wie das bereits in CNB-440 identifizierte **102** nur als Antifraßmittel untersucht.^[76]

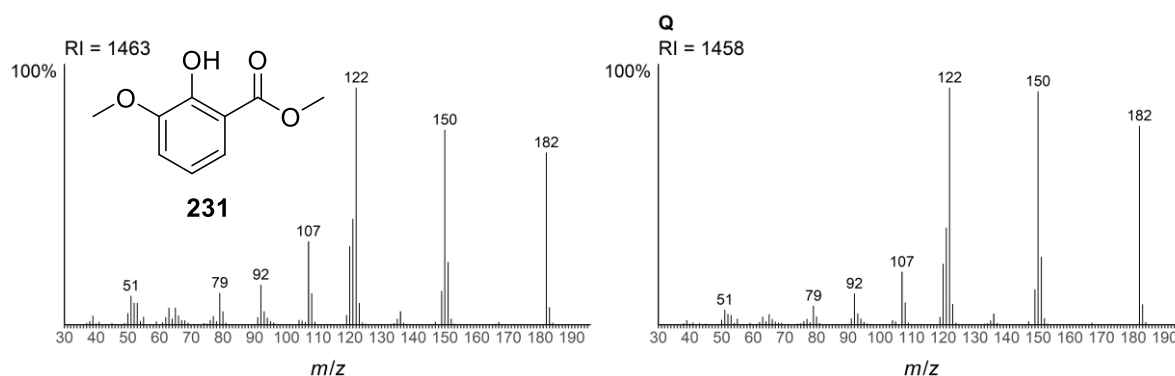


Abbildung 56: Vergleich der Massenspektren von 2-Hydroxy-3-methoxybenzoesäure-methylester (**231**) (links) und der unbekannten Verbindung **Q** (rechts).

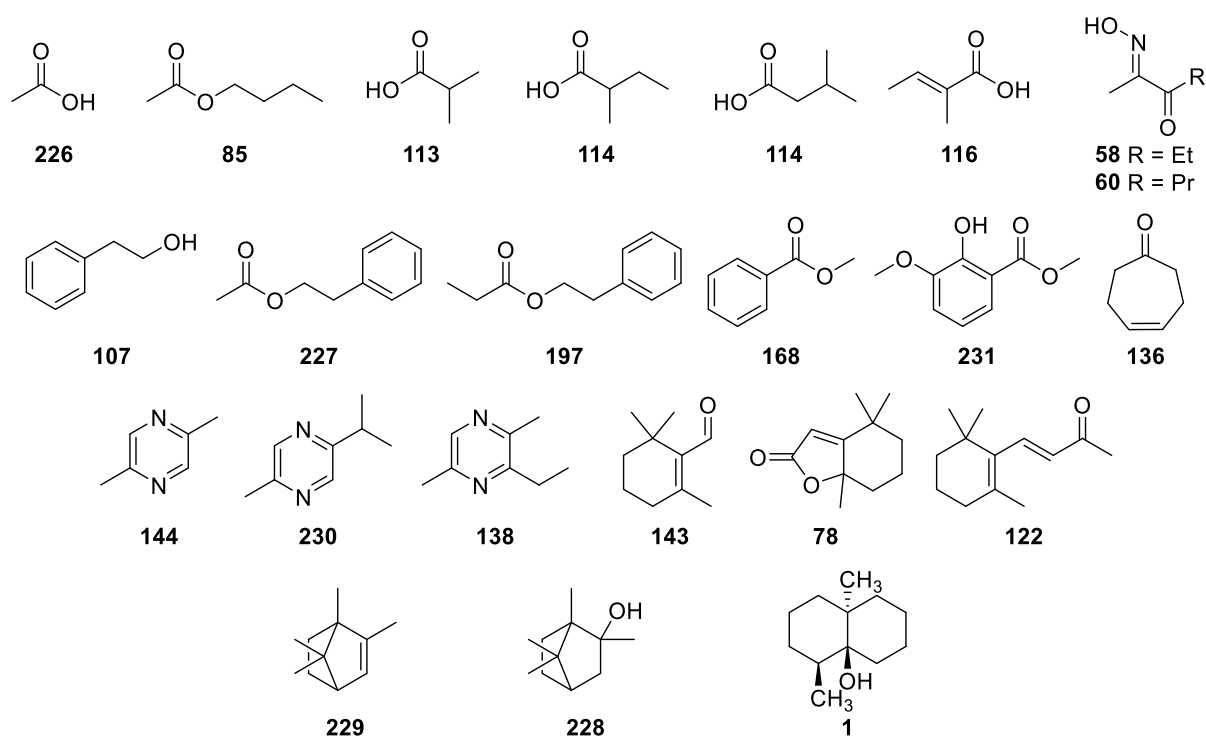


Abbildung 57: Strukturen flüchtiger Substanzen aus *S. goodfellowii* CNY-666.

Tabelle 12: Flüchtige Verbindungen aus den Gasphasenextrakten von *S. goodfellowii* CNY-666. Die Intensitäten der einzelnen Verbindungen werden mit 0-1% (o), 1-10% (x), 10-30% (xx), 30-100% (xxx) relativ zur Gesamtpeakfläche des Totalionenstromchromatogramms angegeben.

Verbindung	RI _{exp} ^a	RI _{lit} ^b	Ident. ^c	OSSA 1 (THG206)	OSSA 2 (THG207)	OSSA 3 (THG208)	CLSA (THG181)
1-Butanol (90)	669	659	ms, ri	x	x	o	-
Essigsäure (226)	678			x	x	x	-
2,3-Pentandion (49)	702	698	ms, ri	o	o	o	-
3-Methyl-3-buten-1-ol (51)	728	730	ms, ri	x	x	o	-
Acetoin (7)	736	713	ms	o	o	o	-
Prenol (50)	770	775	ms, ri	o	o	o	-
Cyclopentanone (154)	783	791	ms, ri	x	x	x	-
2-Methylpropansäure (113)	794	774	ms	x	-	xx	-
3-Hydroxy-2-pentanone (108)	808		ms	o	-	o	o
Essigsäurebutylester (85)	810	812	ms, ri	o	o	-	-
2-Hydroxy-3-pentanone (96)	813	821	ms, ri	o	-	o	o
Verbindung M	833			o	o	o	-
4-Methyl-3-hexanon (111)	836	843	ms, ri	-	-	-	o
4-Hydroxy-4-methyl-2-pentanone (131)	843	838	ms, ri	o	-	o	o
3-Methylbutansäure (115)	867	863	ms, ri	x	-	x	-
2-Methylbutansäure (114)	886	861	ms, ri	x	x	xx	o
o-Xylol (133)	889	887	ms, ri	o	o	-	-
2,5-Dimethylpyrazin (144)	911	917	ms, ri	xx	x	xx	xx
Tiglinsäure (116)	945	928	ms	x	o	o	-
1-Ethyl-3-methylbenzol (135)	959	957	ms, ri	o	o	-	-
1-Heptanol (91)	972	970	ms, ri	o	o	o	-
1,2,4-Trimethylbenzol	991	990	ms, ri	o	o	o	o
6-Methyl-5-hepten-2-ol (157)	994	986	ms, ri	o	-	o	-
Cyclohept-4-enon (136)	1004		ms	o	o	o	-
2-Methyl-2-bornen (229)	1014	994	ms, ri	o	o	o	-
verzweigter Kohlenwasserstoff RI = 1025	1024			-	-	-	x
Benzylalkohol (117)	1033	1036	ms, ri	o	o	o	x
Verbindung N	1045			-	-	-	o
(E)-2-(Hydroxyimino)pentan-3-on (58)	1054	1051	ms, std	x	x	x	xx
α-Methylbenzylalkohol (132)	1060	1061	ms, ri	o	o	o	-
2-Isopropyl-5-methylpyrazin (230)	1061	1059	ms, ri	-	-	-	o
verzweigter Kohlenwasserstoff RI = 1064	1064			-	-	-	x
verzweigter Kohlenwasserstoff RI = 1075	1075			-	-	-	x
3-Ethyl-2,5-dimethylpyrazin (138)	1084	1082	ms, ri	o	o	o	o
verzweigter Kohlenwasserstoff RI = 1087	1087			-	-	-	x
Verbindung H	1088			o	o	-	-
Benzoessäuremethylester (168)	1093	1094	ms, ri	o	o	o	x
2,6-Dimethylcyclohexanol (92)	1105	1112	ms, ri	o	o	o	x
Phenylethylalkohol (107)	1111	1116	ms, ri	xx	xx	xx	xxx
unbekannt 103, 71, 43	1132			-	-	-	o
Verbindung J	1134			o	-	o	o
(E)-2-(Hydroxyimino)hexan-3-on (60)	1141	1142	ms, std	-	-	-	o
unbekannt 152, 137, 111, 98	1152			o	o	o	o
2-Phenyl-1-propanol (80)	1170	1179	ms, ri	-	-	-	o
Menthol (77)	1171	1174	ms, ri	o	-	o	-
Phenyllessigsäuremethylester (88)	1176	1178	ms, ri	o	o	o	x
2-Methylisoborneol (228)	1178	1197	ms, ri	o	o	o	-
p-Methylacetophenon (159)	1183	1178	ms, ri	o	o	o	-
δ-Heptalacton (127)	1184		ms	o	-	-	o
unbekannt 87, 45, 42	1188			-	-	-	o
Salicylsäuremethylester (147)	1191	1192	ms, ri	o	o	o	x
β-Cyclocitral (143)	1218	1220	ms, ri	o	o	o	o
unbekannt 184, 110, 95, 71, 43	1233			o	o	o	o
δ-Lacton RI = 1244	1247			-	-	-	o
Essigsäure-2-phenylethylester (227)	1255	1258	ms, ri	o	o	o	-
δ-Octalacton (129)	1282	1288	ms, ri	-	-	-	o
Trimethylbenzaldehyd (161)	1314		ms	o	o	o	-

verzweigter Kohlenwasserstoff RI = 1322	1322			o	o	-	-
δ-Lacton RI = 1333	1333			-	-	-	o
Propansäure-2-phenylethylester (194)	1351	1350	ms, ri	o	o	o	o
Geosmine (1)	1400			o	-	o	-
unbekannt 154, 125, 111, 69	1436			-	-	-	o
Verbindung Q , 2-Hydroxy-3-methoxybenzoesäuremethylester (231)	1458	1463	ms, std	-	-	-	x
Methylester RI = 1476	1476			o	o	o	-
Verbindung K	1480			-	-	-	o
β-Ionon (122)	1485	1486	ms, ri	o	o	o	o
Methylester M212 RI = 1503	1503			o	o	o	-
unbekannt 212, 181, 128	1510			o	o	o	o
Dihydroactinidiolid (78)	1525	1538	ms, ri	-	-	-	o
Terpenoid RI = 1611	1612			o	o	o	-
Methylester M = 240	1681			o	o	o	-

^adie angegebenen Werte sind Durchschnittswerte aller Messungen, ^bentnommen aus NIST Chemistry WebBook oder unserer eigenen Datenbank, ^cIdentifizierung der Verbindung beruht auf Vergleich des Massenspektrums mit Datenbank Spektrum (ms), Vergleich des Retentionsindex mit Literaturwerten gemessen auf einer gleichartigen Fused-Silica-Kapillarsäule (ri) und/oder direkter Vergleich mit einer synthetischen oder kommerziell erhältlichen Referenz-Verbindung (std)

3.3. Statistische Analyse der Metabolitenprofile

Statistische Analysen von VOC-Metabolitenprofilen ermöglichen die Unterscheidung verschiedener Bakterienspezies^[117] und werden auch in der Metabolomik von mikrobiellen VOCs verwendet, um z.B. Krankheiten anhand von speziellen Duftstoffen^[118] zu erkennen. Oftmals werden dazu allerdings nur einige wenige Marker anstatt der Gesamtheit der Metabolite verwendet.^[119] Mit Hilfe der gewonnenen Daten aus den Headspace-Analysen der *Salinispora*-Bakterien sollte ein Modell entwickelt werden, welches eine Unterscheidung der einzelnen Spezies basierend auf der Zusammensetzung des VOC-Profiles ermöglicht. Es sollte untersucht werden, ob bakterielle Duftprofile artspezifisch und auch zur Unterscheidung wenig abgegrenzter Arten geeignet sind.

3.3.1. Erstellen einer VOC-Datenbank für *Salinispora* Bakterien

Zur automatisierten Detektion der einzelnen Verbindungen in den Headspace Extrakten wurde zunächst eine Datenbank benötigt, die die verschiedenen flüchtigen Metabolite aus den untersuchten *Salinispora* Bakterien enthält. Da kommerzielle Datenbanken wie die *NIST-Library*^[26] nur einen kleinen Teil der bekannten bakteriellen Metabolite enthält, wurde hierfür eine eigene angelegt. Dazu wurden alle während dieser Arbeit durchgeführten Analysen manuell mit AMDIS^[120] ausgewertet. Die Massenspektren der einzelnen Verbindungen aus den GC/MS-Analysen wurden untersucht und gemeinsam mit den Retentionsindices mit Einträgen aus bestehenden Datenbanken abgeglichen. So identifizierte Verbindungen wurden in einer neuen .msl

Datei gespeichert. Ebenso wurden die in dieser Arbeit nachgewiesenen bakteriellen Metabolite und synthetischen Zwischenstufen hinzugefügt. Verbindungen, die nicht zugeordnet werden konnten, wurden als unbekannt mit dem Hinweis auf den analysierten Stamm aufgenommen. Auf diese Weise wurde eine spezielle *Salinispora*-Datenbank mit über 1300 Einträgen erstellt, mit der alle GC/MS Analysen abgeglichen wurden. Mit Hilfe der Datenbank sollen zukünftige Analysen von *Salinispora*-Bakterien erleichtert werden.

3.3.2. Diskriminantenanalyse der Hauptkomponenten

Mit Hilfe des Metabolite Detectors^[121] wurden die Totalionenstromchromatogramme der Proben nach Dekonvolution im Batchverfahren auf ihre Zusammensetzung hin untersucht und mit der eigens erstellten Datenbank abgeglichen. Die Integralwerte der Peaks wurden in relativen Mengen bezogen auf das Gesamtintegral der jeweiligen Messung angegeben. Eine quantitative Bestimmung der jeweiligen Komponenten wurde nicht durchgeführt, da dies für den qualitativen Vergleich der Metabolitenprofile nicht benötigt wurde. Siloxane, Butylhydroxytoluol, Phthalate und ihre Abbauprodukte sowie andere Artefakte und verbreitete Verunreinigungen^[17] wurden anschließend manuell aus dem Datensatz entfernt. Eine Verbindung wurde dann als vom Bakterium produziert angenommen, wenn diese im CLSA-Extrakt oder in mindestens zwei von drei der gemessenen OSSA Replikaten vorkam und nicht in den Blindproben nachgewiesen wurde. Sie wurde auch als nachgewiesen angenommen, wenn sie zwar in der Blindprobe vorkam, aber in der experimentellen Probe die Integrale mindestens um den Faktor 10 größer waren.

Insgesamt konnten so 341 bekannte und unbekannte VOCs in den dreizehn untersuchten *Salinispora*-Stämmen nachgewiesen werden. Anschließend wurden die erhaltenen Daten mit Hilfe gängiger statistischer Methoden untersucht. Dazu wurde zunächst eine Hauptkomponentenanalyse (*principal component analysis*, PCA) anhand der Korrelationsmatrix in R^[122] durchgeführt, um die Anzahl an Variablen zu reduzieren.^[123] Anhand des Kaiser-Kriteriums^[124] wurden die ersten 37 Hauptkomponenten (*principal components*, PCs) mit einer Gesamtvarianz von 98% für eine lineare Diskriminanzanalyse (*linear discriminant analysis*, LDA)^[125] ausgewählt. Damit sollte untersucht werden, anhand welcher Merkmale sich die *Salinispora*-Stämme in der Zusammensetzung ihrer bakteriellen Duftprofile unterschieden. Dieses Verfahren ist auch als DAPC (*discriminant analysis of principal components*)

bekannt.^[126] Mit dem gleichen Verfahren erfolgte zudem eine Trennung in die neuen und in die ursprünglichen drei Spezies *S. arenicola*, *S. pacifica* und *S. tropica* (Abbildung 58). Zwischen den einzelnen Stämmen wird eine Auftrennung entlang der zweiten linearen Diskriminanten (LD) beobachtet. Hauptsächlich grenzt sich CNT-403 von den anderen Bakterien ab. Ein Grund dafür könnte die Produktion von mind. 20 unbekannten Verbindungen sein, welche nur in diesem Stamm gefunden wurden. Trotz der verschiedenen Analysemethoden liegen die einzelnen Datenpunkte von CLSA- und OSSA- Messungen des jeweiligen Stammes sehr nahe beieinander. Zwischen den einzelnen Spezies kommt es zu einer Trennung in fünf verschiedene Cluster entlang der ersten zwei LDs. Davon bestehen drei aus nur je einem Stamm der Spezies *S. fenicalii*, *S. cortesiana* und *S. goodfellowii*. Bei den übrigen Spezies wird eine geringere Trennung beobachtet (Abbildung 58). Bei der Einteilung in die ursprünglichen drei Spezies sind drei deutlich getrennte Cluster entlang LD1 erkennbar. Bei der Verwendung zu vieler PCs kann es jedoch zu sogenanntem „*overfitting*“ kommen.^[127,128] Bei großen Datenmengen können so *ad hoc* Lösungen gefunden werden, welche eine gute Unterscheidung zwischen den untersuchten Individuen ermöglichen, sich aber schlecht bei neuen Daten verhalten.^[126] Zur Validierung der Ergebnisse wurde der sogenannte *a-score* berechnet.^[128] Dieser misst diese Verzerrung durch Berechnung der Differenz der Wahrscheinlichkeiten zwischen der korrekten Zuordnung zu einem realen Cluster und der eines durch Zufallsdaten erzeugten Clusters. Je näher der Wert an eins liegt, desto stabiler ist das DAPC-Modell. Kleine Werte gegen Null sind Kennzeichen für Instabilität und schlechte Unterscheidbarkeit des Modells. Er kann daher auch als Kriterium genutzt werden, um die optimale Anzahl an PCs für die Diskriminanzanalyse auszuwählen.^[126] Für die durchgeführten DAPCs ergeben sich *a-scores* im Bereich von 0.0 – 0.2 (Tabelle 13). Damit liegt ein klarer Fall von *overfitting* vor, sodass das Modell verworfen und ein neuer Ansatz gewählt wurde.

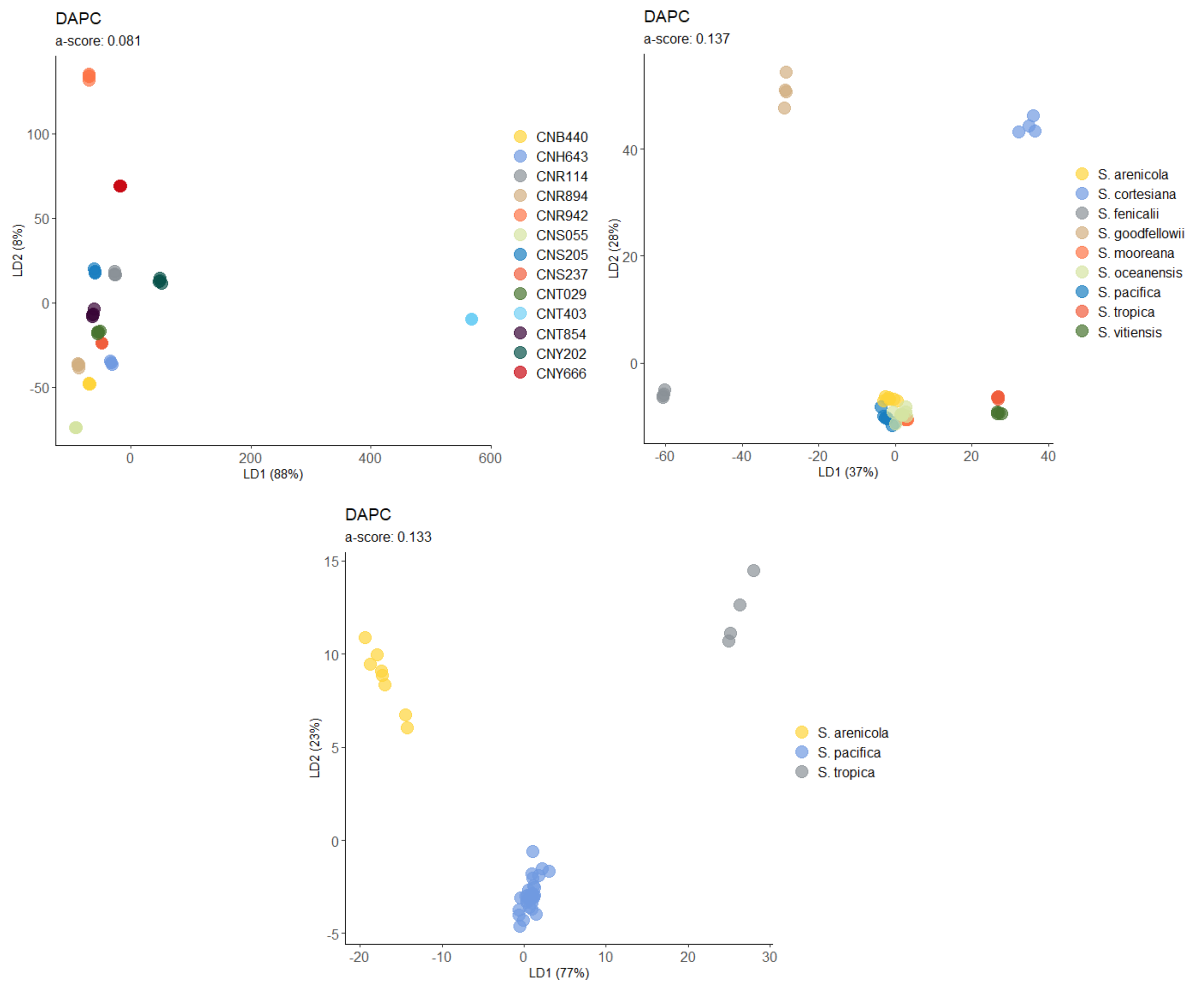


Abbildung 58: DAPC (37 PCs) mit Trennung basierend auf den untersuchten Stämmen (o. links), den einzelnen Spezies (o. rechts) und den ursprünglichen Spezies (unten). Die Achsen zeigen jeweils die Varianz der ersten zwei linearen Diskriminanten.

Tabelle 13: Übersicht über die a-scores für die DAPC mit 37 PCs.

Stamm	Spezies	a-score	Spezies	a-score	Spezies	a-score
CNB-440 ^T	<i>S. tropica</i>	0.0890	<i>S. arenicola</i>	0.1443	<i>S. arenicola</i>	0.1868
CNH-643 ^T	<i>S. arenicola</i>	0.0775	<i>S. cortesiana</i>	0.1900	<i>S. pacifica</i>	0.0383
CNR-114 ^T	<i>S. pacifica</i>	0.0840	<i>S. fenicalii</i>	0.1765	<i>S. tropica</i>	0.1730
CNR-894	<i>S. pacifica</i>	0.0765	<i>S. goodfellowii</i>	0.1985		0.133
CNR-942	<i>S. fenicalii</i>	0.0845	<i>S. mooreana</i>	0.1830		
CNS-055	<i>S. vitiensis</i>	0.0655	<i>S. oceanensis</i>	-0.0523		
CNS-205	<i>S. arenicola</i>	0.0755	<i>S. pacifica</i>	0.0250		
CNS-237	<i>S. mooreana</i>	0.0795	<i>S. tropica</i>	0.1905		
CNT-029	<i>S. oceanensis</i>	0.0810	<i>S. vitiensis</i>	0.1790		
CNT-403	<i>S. oceanensis</i>	0.0900		0.137		
CNT-854	<i>S. oceanensis</i>	0.0915				
CNY-202 ^T	<i>S. cortesiana</i>	0.0825				
CNY-666 ^T	<i>S. goodfellowii</i>	0.0775				
		0.081				

^T = Typenstamm

Da offensichtlich zu viele PCs für die Analyse verwendet wurden, sollte mit Hilfe von Kreuzvalidierung des *adeget*-Pakets^[128] in R die Anzahl optimiert werden (Tabelle 14). Kreuzvalidierung ist eine objektive Optimierungsmethode, die einen Kompromiss

zwischen zu vielen und zu wenig zurückbehaltenen PCs findet.^[129] Dabei wurde die vom *adeget*-Paket vorgegebene Aufteilung von 90% der Daten für den Trainingsdatensatz und 10% für den Testdatensatz verwendet.^[128] Die neuen DAPCs mit der optimierten Anzahl PCs wurde dann erneut mittels des *a-scores* auf *overfitting* überprüft (Tabelle 15). Die Kreuzvalidierung lieferte eine korrekte Zuordnung der Testdatensätze in über 70% der Fälle bei einem RMSE (*root mean squared error*) von 23 - 28% (Tabelle 14). Die gemittelten *a-scores* für die drei Modelle waren mit 0.25 - 0.41 immer noch zu gering.

Tabelle 14: Ergebnisse Kreuzvalidierung zur Optimierung der Anzahl an verwendeten PCs in der DAPC.

	Stämme	Spezies	urs. Spezies
Anzahl PCs:	10	10	20
Erfolgreiche Zuordnung:	0.746	0.790	0.778
RMSE:	0.271	0.238	0.284
Median und Konfidenzintervall für Zufallschance:	2.5%	0.019	0.042
	50%	0.077	0.111
	97.5%	0.135	0.213

Tabelle 15: Übersicht über die *a-scores* der DAPCs mit optimierter Anzahl von PCs.

Stamm	Spezies	a-score	Spezies	a-score	Spezies	a-score
CNB-440 ^T	<i>S. tropica</i>	0.4320	<i>S. arenicola</i>	0.0338	<i>S. arenicola</i>	0.1898
CNH-643 ^T	<i>S. arenicola</i>	0.6870	<i>S. cortesiana</i>	0.7535	<i>S. pacifica</i>	0.0545
CNR-114 ^T	<i>S. pacifica</i>	0.6835	<i>S. fenicalii</i>	0.5505	<i>S. tropica</i>	0.5065
CNR-894	<i>S. pacifica</i>	0.4385	<i>S. goodfellowii</i>	0.5195		0.250
CNR-942	<i>S. fenicalii</i>	0.4170	<i>S. mooreana</i>	0.0060		
CNS-055	<i>S. vitiensis</i>	-0.3275	<i>S. oceanensis</i>	0.2548		
CNS-205	<i>S. arenicola</i>	0.1810	<i>S. pacifica</i>	0.1610		
CNS-237	<i>S. mooreana</i>	0.6800	<i>S. tropica</i>	0.5110		
CNT-029	<i>S. oceanensis</i>	-0.0730	<i>S. vitiensis</i>	0.5190		
CNT-403	<i>S. oceanensis</i>	0.6810		0.368		
CNT-854	<i>S. oceanensis</i>	0.4225				
CNY-202 ^T	<i>S. cortesiana</i>	0.6680				
CNY-666 ^T	<i>S. goodfellowii</i>	0.4335				
		0.410				

^T = Typenstamm

Eine Erklärung könnte die Auswahl der Test- und Trainingsdatensätze bei der Kreuzvalidierung sein, da keine Replikate bei der CLSA angefertigt wurden. Bei der Aufnahme dieser Daten in den Testdatensatz kann durch die unterschiedlichen Ergebnisse beider Analysen keine korrekte Zuordnung erfolgen. Daher kommt es zu keiner eindeutigen Zuordnung für die Gruppenzugehörigkeit der einzelnen Messungen (Abbildung 59). Eine Ausnahme bildet der Stamm CNT-403. Da hier alle Analysen eindeutig Zugeordnet werden konnten, muss die Zusammensetzung der Extrakte aus

CLSA und OSSA sehr ähnlich sein. Weiterhin gibt es eine große Übereinstimmung bei den OSSA Replikaten von CNB-440, CNR-942 und CNY-666. Die anderen Analysen konnten nicht mehrheitlich einem Stamm zugeordnet werden. Dies zeigt, dass es hier starke Unterschiede zwischen den Ergebnissen der beiden Analysemethoden gab. Bei der Gruppenzugehörigkeit zu den jeweiligen Spezies konnte das Modell nicht zwischen den Spezies *S. arenicola*, *S. pacifica* und *S. oceanensis* differenzieren.

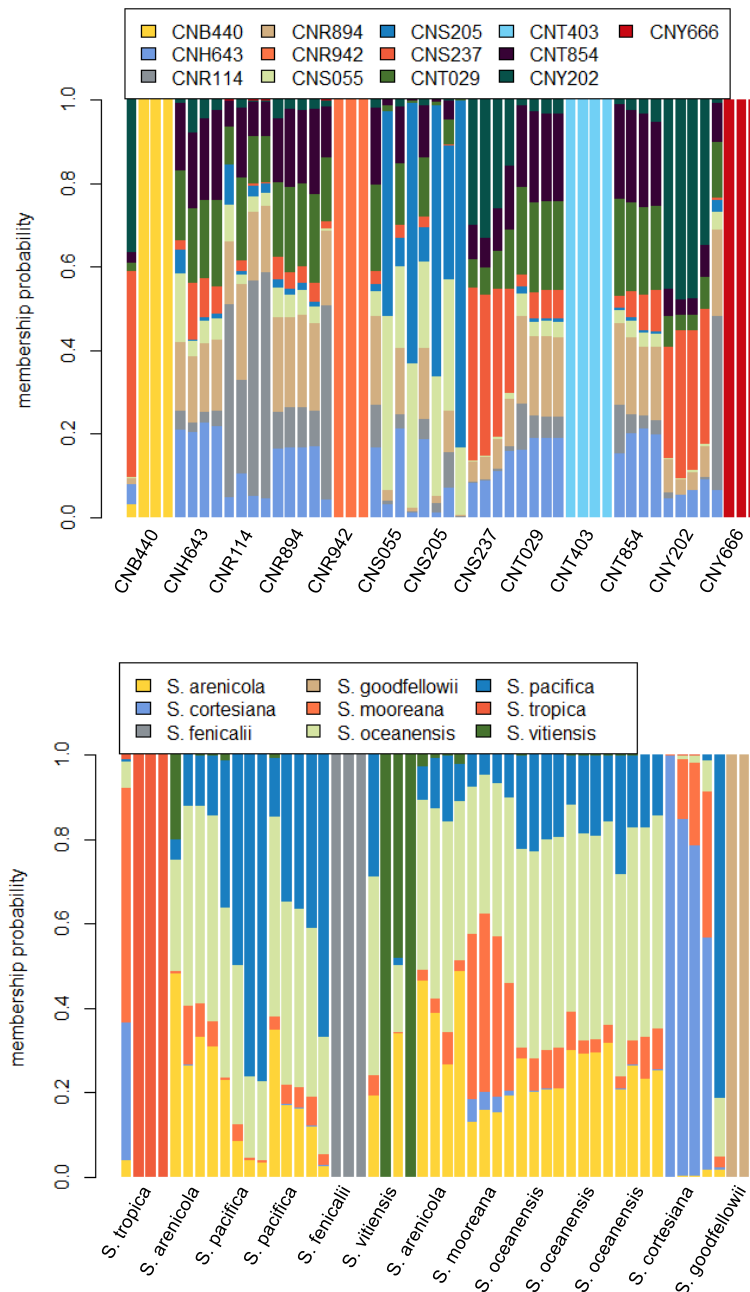


Abbildung 59: Zuordnungswahrscheinlichkeit der zwei Modelle aus der Trennung nach den Stämme (oben) und den Spezies (unten) aus der DAPC.

Da einige Stämme bzw. auch einzelne Spezies dennoch richtig klassifiziert werden konnten, erschien eine Einteilung basierend auf dem Metabolitenprofil nicht völlig

unmöglich und nur die Auswahl der Daten war nicht optimal. Obwohl viele Verbindungen nur mittels CLSA nachgewiesen werden konnten, wurden im weiteren Verlauf ausschließlich die Daten der OSSA verwendet, da diese eine bessere Reproduzierbarkeit zeigten. Demnach wurden nur noch 250 Metabolite als Variablen für die weiteren Untersuchungen verwendet. Die Anzahl der verwendeten PCs für die DAPC wurde erneut anhand von Kreuzvalidierung ausgewählt und die Trennung hinsichtlich der einzelnen Stämme, der neuen Spezies, sowie der ursprünglichen Spezies durchgeführt. Die ausgewählten 8 PCs spiegeln hier eine Varianz von insgesamt 71% des Datensatzes wider. Das erste Modell liefert eine erfolgreiche Zuordnung in 88.7% der Fälle bei einem RMSE (*root mean squared error*) von 13.4% (Tabelle 17). Unter diesen Voraussetzungen sind die Metabolitenprofile der einzelnen Bakterien charakteristisch und ermöglichen eine Unterscheidung zwischen den einzelnen Stämmen.^[21,108,130] Bei den Gruppenzuordnungen der einzelnen Replikate gibt es nur vereinzelt kleinere Abweichungen. So unterscheidet sich eins der Replikate von CNR-114 deutlich von den anderen beiden, wodurch auch der schlechte *a-score* des Stammes zu erklären ist. Die Trennung hinsichtlich der Spezies liefert sowohl die höchste Zuordnungswahrscheinlichkeit mit 92.6% (RMSE 10.5%), als auch den besten gemittelten *a-score* von 0.674. Es gibt erneut eine deutliche Trennung der Spezies *S. fenicalii*, *S. cortesiana* und *S. goodfellowii* (Abbildung 61). Die anderen Spezies besitzen untereinander ein ähnlicheres Metabolitenprofil. Eine Trennung in die ursprünglichen drei *Salinispora*-Spezies liefert erneut keine stabile Zuordnung. Der *a-score* wurde durch den Ausschluss der CLSA-Ergebnisse nicht verbessert (Tabelle 17). Weiterhin ist der Median für eine zufällige Zuordnung hier mehr als dreimal so hoch wie in den anderen Modellen (Tabelle 16). Eine Unterscheidung ist zwar noch möglich, allerdings besteht eine recht hohe Chance, dass die Einteilung nur zufallsbasiert ist. Auf eine weitere Untersuchung dieses Modells wurde daher verzichtet. Sowohl das Spezies- als auch das Stämme-Modell sind in der Lage, gut zwischen den einzelnen Gruppenmitgliedern zu unterscheiden und sagen mit hoher Wahrscheinlichkeit die korrekte Zugehörigkeit voraus. (Abbildung 60).

Tabelle 16: Ergebnisse Kreuzvalidierung zur Optimierung der Anzahl an verwendeten PCs in der OSSA-DAPC.

	Stämme	Spezies	urs. Spezies
Anzahl PCs:	8	8	20
Erfolgreiche Zuordnung:	0.887	0.926	0.861
RMSE:	0.135	0.105	0.205
Median und Konfidenzintervall für Zufallschance:	2.5%	0.000	0.019
	50%	0.077	0.099
	97.5%	0.154	0.216

Tabelle 17: Übersicht über die *a*-scores der DAPCs aus der OSSA mit optimierter Anzahl von PCs.

Stamm	Spezies	<i>a</i> -score	Spezies	<i>a</i> -score	Spezies	<i>a</i> -score
CNB-440 ^T	<i>S. tropica</i>	0.6673	<i>S. arenicola</i>	0.6477	<i>S. arenicola</i>	0.3347
CNH-643 ^T	<i>S. arenicola</i>	0.6833	<i>S. cortesiana</i>	0.7600	<i>S. pacifica</i>	0.0790
CNR-114 ^T	<i>S. pacifica</i>	0.3333	<i>S. fenicalii</i>	0.7133	<i>S. tropica</i>	0.2266
CNR-894	<i>S. pacifica</i>	0.6800	<i>S. goodfellowii</i>	0.7227		0.213
CNR-942	<i>S. fenicalii</i>	0.6800	<i>S. mooreana</i>	0.7407		
CNS-055	<i>S. vitiensis</i>	0.6720	<i>S. oceanensis</i>	0.3613		
CNS-205	<i>S. arenicola</i>	0.6760	<i>S. pacifica</i>	0.6547		
CNS-237	<i>S. mooreana</i>	0.6627	<i>S. tropica</i>	0.7547		
CNT-029	<i>S. oceanensis</i>	0.6867	<i>S. vitiensis</i>	0.7147		
CNT-403	<i>S. oceanensis</i>	0.6860		0.674		
CNT-854	<i>S. oceanensis</i>	0.6573				
CNY-202 ^T	<i>S. cortesiana</i>	0.6907				
CNY-666 ^T	<i>S. goodfellowii</i>	0.6800				
		0.650				

^T = Typenstamm

Anhand des Spezies-Modells sollten nun Verbindungen gefunden werden, die für die Differenzierung untereinander verantwortlich sind. Dazu wurden über die *loadings* der einzelnen PCs die Anteile der verschiedenen VOCs an den drei LDs berechnet (Tabelle 18). LD1 ist hauptsächlich für die Unterscheidung zwischen *S. fenicalii* und dem Rest der untersuchten Spezies verantwortlich. Den größten Anteil daran haben Propansäure, Linalylacetat (**155**), Cyclohexan, sowie die diversen Diterpene, die alle nur im untersuchten Stamm CNR-942 gefunden wurden. Da jedoch nur dieser eine Stamm repräsentativ für die Spezies analysiert wurde, kann keine Aussage über andere *S. fenicalii*-Bakterien gemacht werden. Den größten Anteil an LD2 und damit an *S. cortesiana* hat neben diversen γ -Lactonen, Acetoin (**7**) und Dihydroactinidiol (**78**) die unbekannte Verbindung **R**. Obwohl das Bakterium nur eine schwache Orangefärbung aufweist, wurden hier die größten Mengen des Norcarotenoids **78** in allen Proben gemessen.

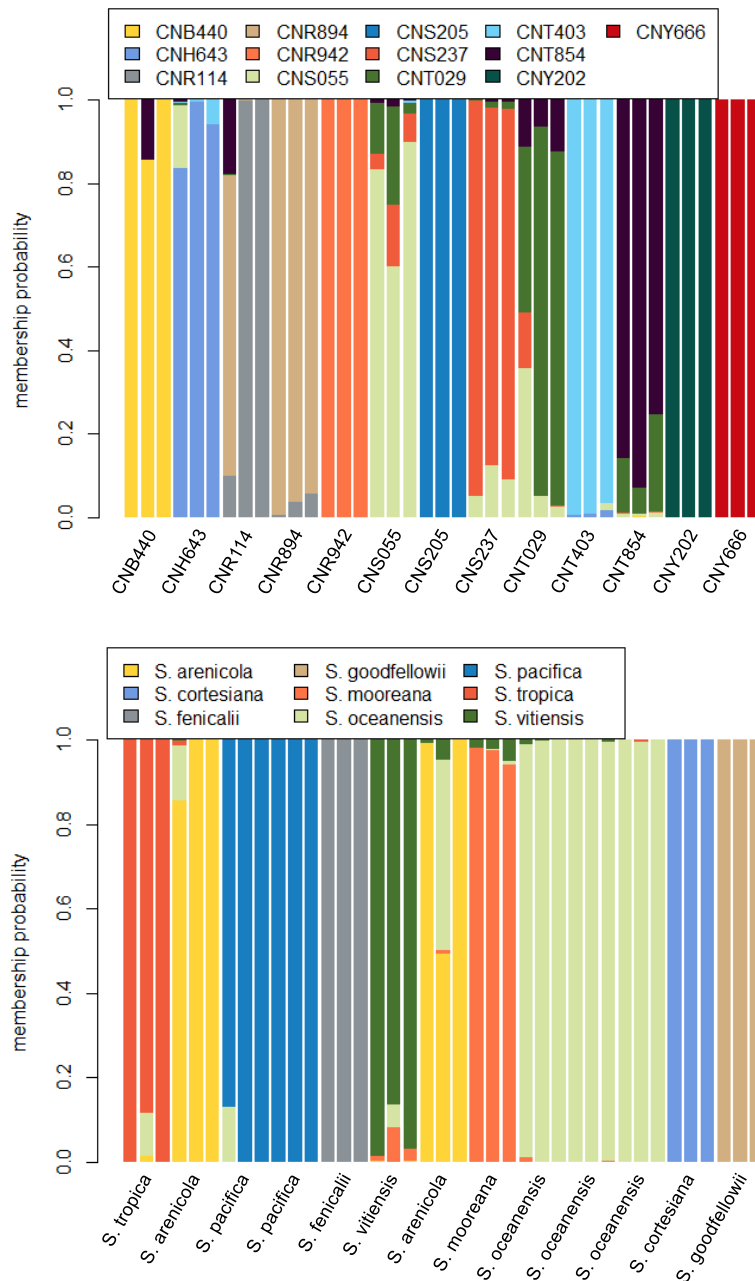


Abbildung 60: Zuordnungswahrscheinlichkeit der zwei Modelle aus der Trennung nach den Stämmen (oben) und den Spezies (unten) aus der OSSA-DAPC.

LD3 hat hauptsächlich Anteil an der Trennung der drei genannten Spezies vom Hauptcluster. Auffällig ist die Tatsache, dass zwei der sich abgrenzenden Stämme (CNR-942 und CNY-666) nicht den *spt*-Gencluster besitzen und somit keine Salinilactone produzieren können. Da weniger flüchtige Verbindungen wie die Salinilactone vergleichsweise schlechter in der OSSA nachgewiesen werden konnten, kann über deren Auswirkungen auf das statistische Modell keine Aussage gemacht werden.

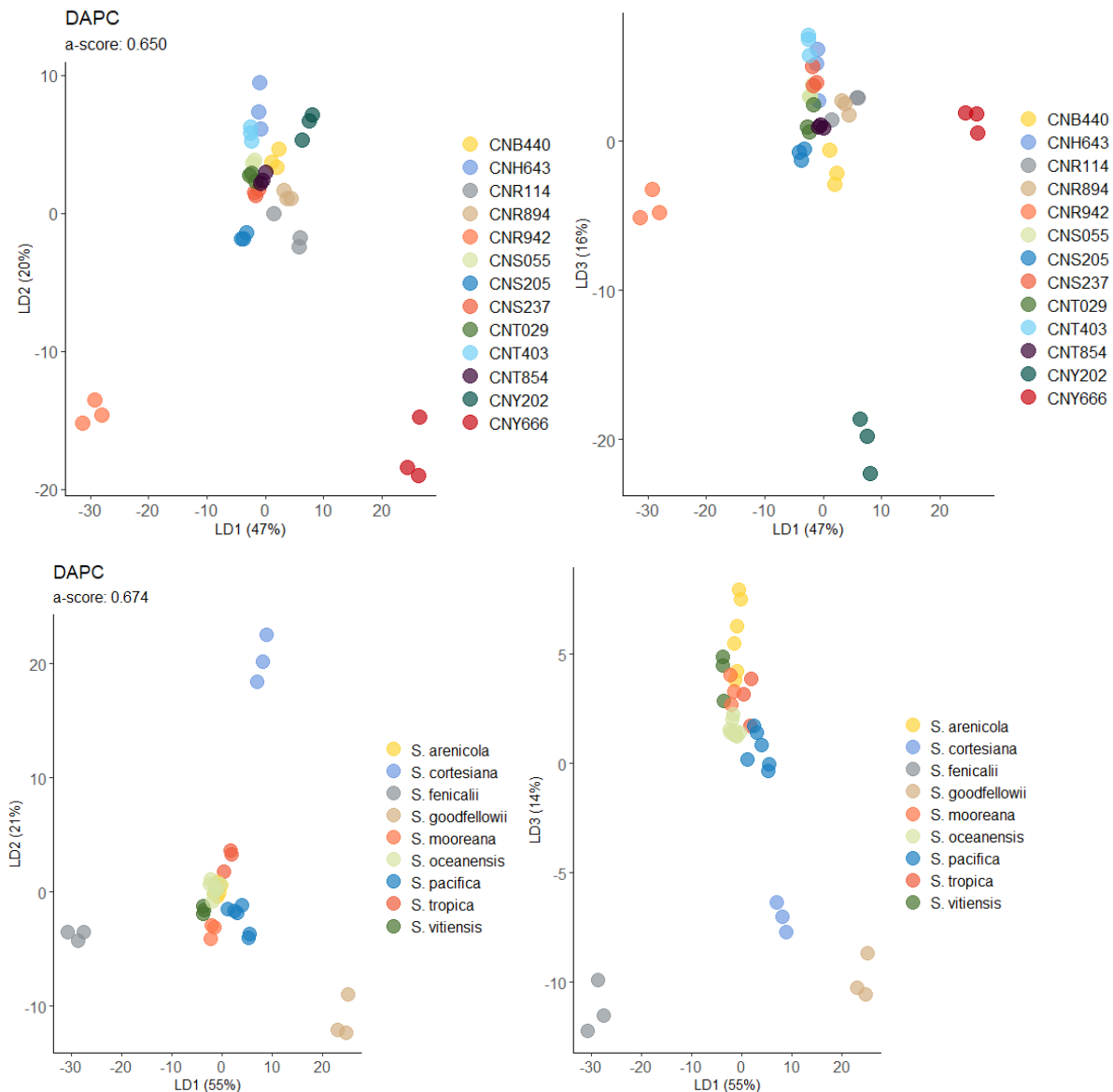


Abbildung 61: Ergebnisse der OSSA-DAPC mit Trennung nach den Stämmen (oben) und Spezies (unten). Dargestellt sind jeweils die Trennung entlang LD1 & LD2 sowie LD1 & LD3 die ersten zwei linearen Diskriminanten.

Es konnte eindeutig gezeigt werden, dass mit der verwendeten Methode eine Zuordnung in die ursprünglichen drei Spezies anhand des Metabolitenprofils nicht möglich ist. Besonders der niedrige *a-score* von *S. pacifica* (~0.04) zeigt, dass das Modell erhebliche Probleme bei der Zuordnung hat. Die sechs neuen Spezies besitzen ihr eigenes charakteristisches Duftprofil, welche sich deutlich von den Profilen der anderen Bakterien aus *S. pacifica* unterscheiden. Die genetische Diversität äußert sich demnach auch in der Produktion flüchtiger Verbindungen. Die für die Unterscheidung der Duftprofile signifikanten Verbindungen werden nur in sehr geringen Konzentrationen produziert. Es handelt sich dabei hauptsächlich um Terpene und Lactone (Tabelle 18). Obwohl diverse Terpene bereits aus Bakterien bekannt sind, gibt es nur wenige Informationen über ihre ökologischen Funktionen.^[17] Lactone sind

häufige Signalmoleküle.^[9,80] Sie und ihre Abbauprodukte treten ebenfalls in verschiedenen Bakterien auf.^[4] Die einzelnen Spezies könnten sich daher durch die Verwendung verschiedener Signalmoleküle unterscheiden. Die meisten in höheren Konzentrationen gebildeten Verbindungen wie Phenylethylalkohol (**107**) und (*E*)-2-(Hydroxyimino)pentan-3-on (**58**) werden von sehr vielen Stämmen produziert und eignen sich daher nicht als Unterscheidungsmerkmal. Weiterhin hat die Wahl der Analysemethode einen signifikanten Einfluss auf die Ergebnisse der Analyse. Bei der Identifizierung von Bakterien mittels VOCs ist ohne genaues Wissen über die Gesamtheit des Metabolitenprofils daher Vorsicht geboten.

Anhand des hier entwickelten Modells ließen sich die Spezies sehr gut anhand der volatilen Verbindungen differenzieren und somit auch wenig abgegrenzte Arten auseinanderhalten. Viele Spezies sind jedoch nur durch einen einzigen Stamm repräsentiert. Um auszuschließen, dass die gute Differenzierbarkeit nicht nur auf der Einzigartigkeit der einzelnen Duftprofile zurückzuführen ist, muss das Modell durch weitere Bakterien erweitert werden. Ein einzelner Stamm kann mit der Varianz an produzierten Metaboliten nicht repräsentativ für die gesamte Spezies sein, wie sich in den unterschiedlichen Duftprofilen von *S. oceanensis* zeigte. Bisher sind allerdings nur wenige Stämme den neuen *Salinispora*-Spezies zugeordnet worden.^[37] Durch genetische Untersuchungen wird diese Zahl zukünftig weiter steigen, sodass eine Erweiterung möglich ist und das Modell für *Salinispora*-Bakterien eine noch stärkere Aussagekraft bekommt. Weiterhin könnte das Verfahren auch für andere Bakterien oder Mikroorganismen zur Analyse der volatilen Verbindungen Anwendung finden.

Tabelle 18: VOCs mit einem Anteil an den Linearen Diskriminanten $\geq 2.00\%$. Terp

LD1	LD2	LD3
Diterpen 272, 229, 159, 145	3.82% γ -Nonalacton (166)	4.69% Trimethylbenzaldehyd (161) 3.43%
Diterpen 272, 229, 134, 119, 93, 81	3.80% Dihydroactinidiolid (78)	4.69% Terpenoid RI = 1611 3.17%
Diterpen 272, 257, 229	3.79% γ -Thiobutyrolacton	4.49% Methylester RI = 1476 3.15%
Diterpen 272, 229, 173, 159, 145	3.78% Verbindung R	4.05% Cyclopentanon (154) 2.69%
Propansäure	3.69% Acetoin (7)	4.02% Cyclohept-4-enon (136) 2.68%
Linalylacetat (155)	3.45% 5-Methyl-3-hexanon (111)	3.81% 2,6-Dimethylcyclohexanol (92) 2.58%
Cyclohexan	3.30% 2,3-Butandion (48)	3.60%
unbekannt 108, 79, 66	2.50% γ -Decalacton	3.36%
2,6-Diethylpyrazin	2.50% verzweigter Kohlenwasserstoff RI = 1053	3.34%
α -Terpinylacetat (156)	2.42% γ -Octalacton (128)	3.33%
β -Ionon (122)	2.36% (<i>E</i>)-2-Methylbut-2-en-1-ol (52)	3.14%
Diterpen 272, 229, 204, 119	2.32% unbekannt 272, 229, 159, 145	2.83%
unbekannt 212, 181, 128	2.11% Geraniumsäuremethylester (137)	2.70%
Verbindung M	2.03% 4-Methyl-2-pentensäuremethylester (86)	2.25%
	2-Coumaranon (160)	2.07%
	verzweigter Kohlenwasserstoff RI = 1033	2.05%
	unbekannt 181, 163, 105, 91, 75	2.00%

3.4. Chemische Kommunikation durch VOCs

In einer Reihe von Kommunikationsexperimenten sollte untersucht werden, wie sich VOCs aus anderen Bakterien auf das Wachstum und die Duftprofile von *Salinispora*-Bakterien auswirken. Dazu wurden 11 Bakterien der Gattungen *Alteromonas*, *Pseudoalteromonas*, *Bacillus*, *Laberenzia*, *Vibrio*, *Shimia*, *Erythrobacter*, *Ruegeria* und *Salinispora* ausgewählt, von denen bekannt war, dass sie auf *Salinispora*-Bakterien phänotypisch reagieren (Tabelle 19).^[131] Als Referenzstämme wurden CNB-440 und CNS-205 ausgewählt, da sie schnell auf Plattenkulturen anwachsen und ihr Duftprofil bereits untersucht und größtenteils aufgeklärt ist. Um die Auswirkungen von nichtflüchtigen Verbindungen auszuschließen, wurden die Experimente auf geteilten oder separaten Agarplatten durchgeführt (Abbildung 63). Zunächst wurde der Einfluss auf das Wachstum der Bakterien beobachtet. Dazu wurde jeweils eine Kolonie des Bakteriums mit einem der Referenzstämme auf einer geteilten Agarplatte angeimpft und für eine Woche in den Brutschrank gestellt. Parallel dazu wurden Experimente mit Einzelkolonien durchgeführt. Danach wurde das Wachstum im Kommunikationsexperiment mit dem in den Einzelkolonien verglichen. Die Kombinationen, bei denen ein sichtbarer Unterschied im Wachstum von einem der beiden Bakterienstämme zu erkennen war, wurden dann in einer zweiten Reihe von Experimenten auf die Veränderungen im Duftprofil hin untersucht. Dazu wurden eine Woche gewachsene Einzelkolonien auf Agarplatten zusammen mit einem der Referenzstämme in ein geschlossenes Glasgefäß gegeben und für 24 h in den Brutschrank gestellt, damit sich die VOCs der beiden Bakterien in der Gasphase verteilen konnten (Abbildung 62). Danach wurde ein Headspace-Extrakt mittels CLSA gewonnen und per GC/MS analysiert.

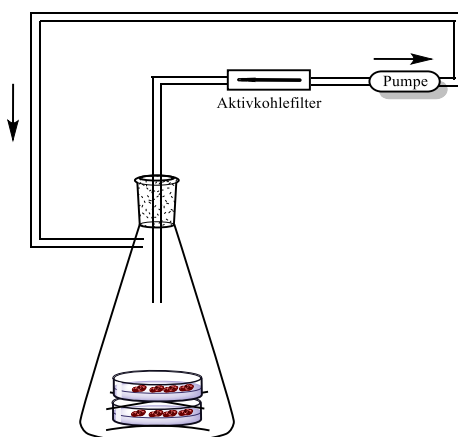


Abbildung 62: Schematischer Aufbau der CLSA-Apparatur zur Extraktion der flüchtigen Verbindungen in Kommunikationsexperimenten.

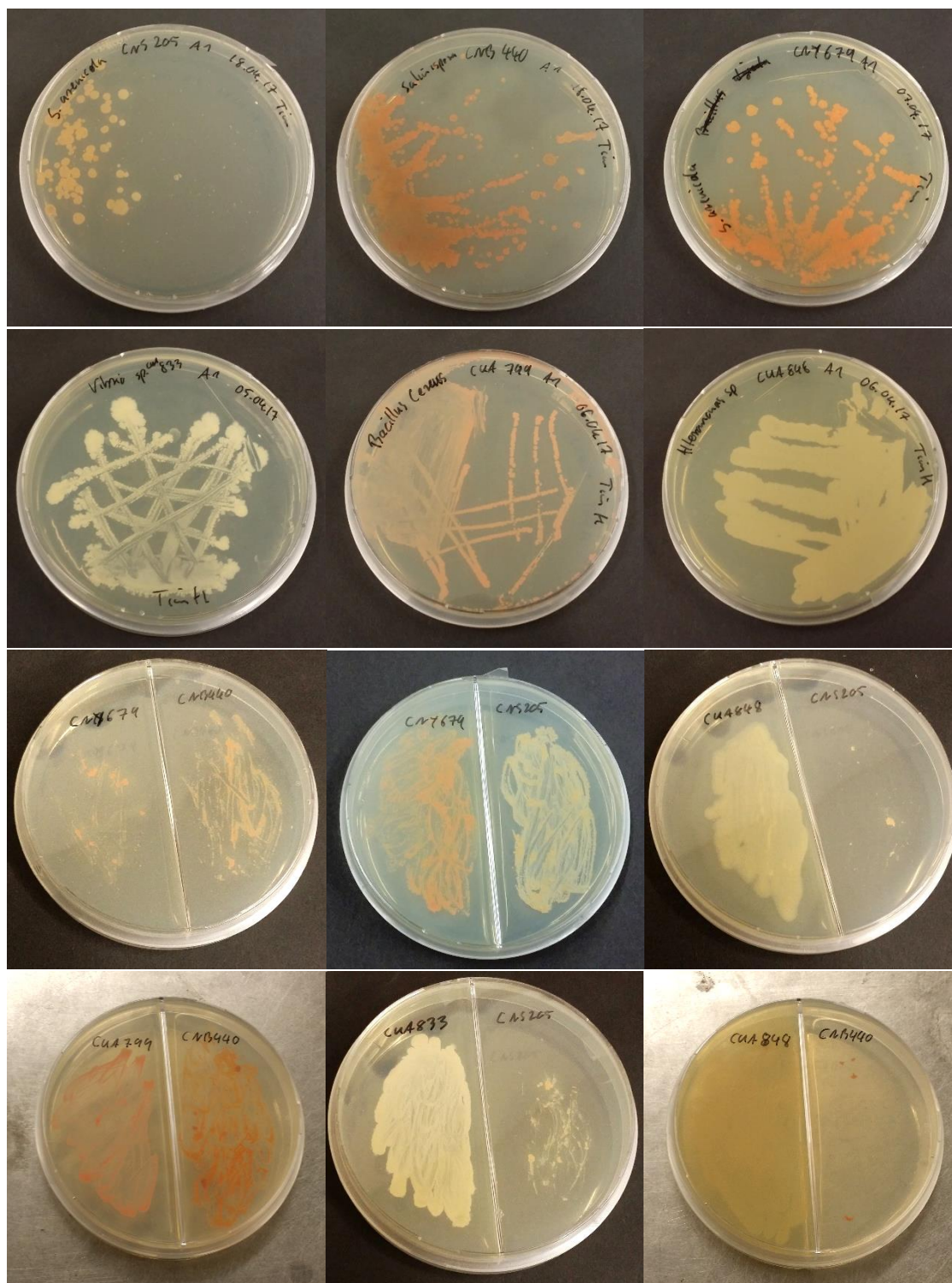


Abbildung 63: Beispiele einiger Agar-Platten von Einzel- und Dualkulturen zur Beobachtung des Einflusses volatiler Verbindungen auf des Wachstumsverhalten.

Tabelle 19: Verwendete Bakterienstämme für die Kommunikationsexperimente mit *Salinispora*-Bakterien.

Bakterienstamm	Kulturmedium
<i>Pseudoalteromonas</i> sp. CUA-898	A1
<i>Vibrio</i> sp. CUA-833	A1
<i>Shimia</i> sp. CUA-847	A1
<i>Ruegeria lacuscaerulensis</i> CUA-829	A1
<i>Labrenzia</i> sp. CUA-892	A1
<i>Labrenzia</i> sp. CUA-809	A1
<i>Bacillus cereus</i> CUA-799	A1
<i>Alteromonas</i> sp. CUA-848	A1
<i>S. arenicola</i> CNY-679	A1
<i>Erythrobacter flavus</i> CUA-862	A1
<i>Bacillus algalicola</i> CUA-796	A1
<i>Pseudoalteromonas</i> sp. CUA-898	A1
<i>Vibrio</i> sp. CUA-833	A1

3.4.1. Einfluss volatiler Verbindungen auf das Wachstum

In der ersten Reihe an Experimenten wurden die beiden Referenzstämme CNB-400 und CNS-205 mit den 11 Bakterienstämmen kultiviert und deren gemeinsames Wachstum mit dem Stamm in Einzelkultur verglichen (Tabelle 20). Bei fünf von 22 Experimenten konnte ein vermindertes und bei drei ein verbessertes Wachstum der Referenzstämme beobachtet werden. Bei drei Tests mit CNS-205 als Referenz kam es zu einem vermehrten Wachstum des einen, und einem verminderten Wachstum des anderen Stamms. Weiterhin kam es zu einem verbesserten Wachstum von *B. algalicola* CUA-796 in Gegenwart von CNB-440. Einzig bei der gemeinsamen Kultivierung der beiden *Salinispora*-Bakterien CNY-679 und CNB-440 kam es zu einer gegenseitigen Hemmung. Bei neun Kommunikationsexperimenten kam es zu keiner optischen Veränderung. Die Dualkulturen, bei der eine optische Veränderung im Wachstum zu sehen war, wurden anschließend mittels GC/MS auf Veränderungen in den Metabolitenprofilen untersucht.

Tabelle 20: Ergebnisse der Wachstumsexperimente von den 11 Bakterienstämmen (links) mit den Referenzstämmen CNB-440 und CNS-205 (rechts). o keine Änderung, - geringeres Wachstum, + erhöhtes Wachstum.

	<i>S. arenicola</i> CNS-205	<i>S. tropica</i> CNB-440
<i>Pseudoalteromonas</i> sp. CUA-898	o / -	o / o
<i>Vibrio</i> sp. CUA-833	+ / -	o / +
<i>Shimia</i> sp. CUA-847	- / +	o / o
<i>Ruegeria lacuscaerulensis</i> CUA-829	o / -	o / o
<i>Labrenzia</i> sp. CUA-892	- / +	o / o
<i>Labrenzia</i> sp. CUA-809	o / o	o / +
<i>Bacillus cereus</i> CUA-799	o / o	o / o
<i>Alteromonas</i> sp. CUA-848	o / -	o / -
<i>S. arenicola</i> CNY-679	o / +	- / -
<i>Erythrobacter flavus</i> CUA-862	o / o	o / o
<i>Bacillus algicola</i> CUA-796	o / -	+ / o

3.4.2. Veränderungen der Metabolitenprofile in Kommunikations-experimenten

Die Duftprofile der einzeln kultivierten Bakterien wurden mit denen aus den Kommunikationsexperimenten verglichen um nachzuweisen, ob neue Verbindungen produziert wurden oder wie sich die Produktion von *Salinispora* bekannten Verbindungen veränderte (Abbildung 64). Dazu wurden, wie schon bei der statistischen Auswertung, zunächst die GC/MS-Analysen mittels des Metabolite Detectors^[121] ausgewertet und mit der erstellten Datenbank der *Salinispora*-Metabolite verglichen. Die Integralwerte der Peaks wurden in relativen Mengen bezogen auf das Gesamtintegral der jeweiligen Messung angegeben. Zunächst wurden die relativen Mengen aus einem Blindwert zusammen mit denen der Einzelmessung von den Analysen der Kommunikationsexperimente abgezogen. Mit Hilfe der absoluten Differenz wurde zunächst nach Metaboliten mit der größten Zu- oder Abnahme gesucht.

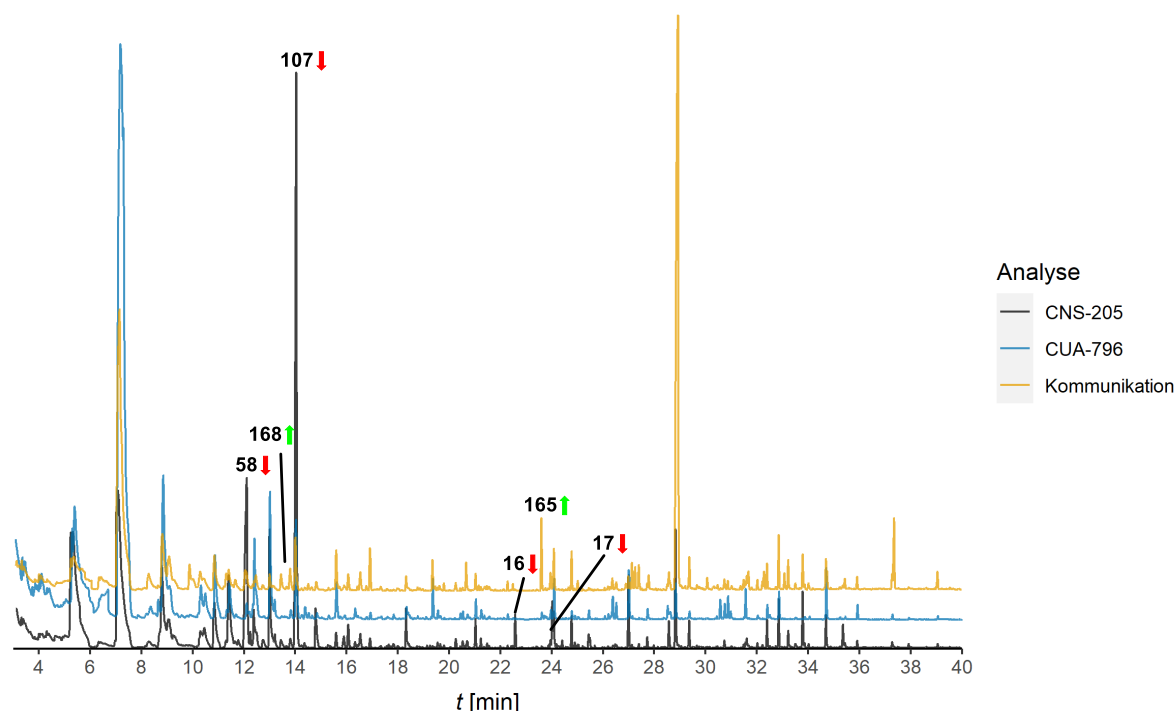


Abbildung 64: GC/MS Chromatogramme der Einzelmessungen von *S. arenicola* CNS-205 und *B. algicola* CUA-796 sowie der Dualkultur. Sowohl das Oxim **58**, der Alkohol **107** und auch die beiden Salinilactone **16** und **17** wurden in deutlich geringeren Mengen gemessen. Ein Anstieg hingegen war bei den beiden Verbindungen Benzoessäuremethylester (**168**) und Geranylaceton (**165**) zu beobachten.

In vielen Experimenten konnte ein Anstieg von Prenol (**50**) und 6-Methyl-5-hepten-2-on (**173**) beobachtet werden. Jedoch konnte keine Korrelation zwischen dem Anstieg dieser Metabolite und dem Wachstumsverhalten beobachtet werden. Vielmehr ergaben sich individuelle Änderungen im Duftprofil für die jeweiligen Bakterienkombinationen. Die Verbindungen mit der größten Abnahme waren in allen Experimenten 2,5-Dimethylpyrazin (**144**), Benzaldehyd und andere Verbindungen, die hauptsächlich vom Medium produziert werden. In vielen Proben von CNS-205 konnte eine Abnahme von Phenylethylalkohol (**107**) beobachtet werden. Zudem kam es in allen Proben von CNS-205, CUA-809 und CUA-892 zu einem Rückgang von Nicotinsäuremethylester (**27**). Weiterhin konnte zwischen CNB-440 und CUA-848 bzw. CNY-679 eine geringe Produktion von Anthranilsäuremethylester (**40**) beobachtet werden, wohingegen mit CUA-833 und CUA-796 keine Veränderung zu sehen war. Darüber hinaus war in vielen Analysen ein Rückgang des Oxims **58** zu sehen. Eine Aussage über die Effekte dieser Verbindungen konnte auf diesem Weg nicht getroffen werden, da kein einheitlicher Trend zu beobachten war.

Aufgrund der Komplexität der Metabolitzusammensetzung wurde der Fokus daher auf die neu identifizierten Oxime **58-62** und die Salinilactone **16-22** gelegt. Zusätzlich wurden die neu identifizierten Sulfinamide **24-25**, Imine **26, 31, 34-38**, sowie die von

GROENHAGEN^[41] identifizierten Cyclohexenyl-Derivate **14** und **15** als typische *Salinispora*-Metabolite analysiert (Tabelle 21 & Tabelle 22).

In fast allen Kommunikationsexperimenten wurden weniger oder keine Salinilactone beobachtet. Lediglich bei der Co-Kultivierung von CNB-440 mit CNY-679, bei der eine beidseitige Hemmung beobachtet wurde, kam es zu einem Anstieg in der Produktion von Salinilacton A-C (**16-18**). Dies stimmt mit der Beobachtung von SCHLAWIS überein, dass Salinilactone einen inhibierenden Effekt gegen verwandte Spezies besitzen.^[43] Ebenso sank auch die Produktion der Oxime in Gegenwart anderer Bakterien. Eine Ausnahme war das methylverzweigte Oxim **62**, bei dem in zwei Analysen ein geringer Anstieg zu beobachten war. Eine Korrelation zwischen den veränderten Metabolit-Konzentrationen und dem Wachstum wurde nicht festgestellt.

Viele der untersuchten Imine konnten erstmals oder in höheren Konzentrationen bei der Interaktion mit anderen Bakterien nachgewiesen werden. Aufgrund des Versuchsaufbaus kann allerdings nicht ermittelt werden, welche der beiden Spezies für die Produktion verantwortlich war. Die Ergebnisse korrelieren ebenfalls nicht mit dem beobachteten Wachstumsverhalten, sodass die untersuchten Imine wohl keine wachstumsverändernden Eigenschaften besitzen.

Ob eine aktive Hemmung des Bakterienwachstums durch VOCs ausgelöst wurde oder zu einer Veränderung des Stoffwechsels führte, ist nicht klar. Die Beobachtungen deuten allerdings darauf hin, dass sich die Bakterien untereinander erkennen und spezifisch auf die Anwesenheit reagieren.

Tabelle 21: Veränderungen in den Konzentrationen ausgewählter Metabolite während der Kommunikationsexperimente mit *S. arenicola* CNS-205. (x): vom Stamm produziert, (+): erhöhte Konzentration, (-): verringerte Konzentration, (0) keine Produktion.

	CNS-205	CUA-898	Dualkultur	CUA-848	Dualkultur	CUA-796	Dualkultur	CUA-892	Dualkultur	CNY-679	Dualkultur	CUA-833	Dualkultur	CUA-847	Dualkultur	CUA-892	Dualkultur
Salinilacton A (16)	x		0	0	0				-	x	0		0		0		-
Salinilacton B (17)	x		0	0	0				-	x	0		0		0		-
Salinilacton C (18)	x		0	0	0				-		-		0		0		-
Salinilacton D (19)																	
Salinilacton E (20)																	
Salinilacton F (21)	x		0	0	0				-		0		0		0		-
Salinilacton G (22)	x		0	0	0				0		0		0		0		0
(E)-3-(Hydroxyimino)butan-2-on (59)										x	0						
(E)-2-(Hydroxyimino)pentan-3-on (58)	x		0	0	-				-	x	0		0		-		-
(E)-2-(Hydroxyimino)hexan-3-on (60)										x	-						
(E)-2-(Hydroxyimino)-4-methylpentan-3-on (62)									+	x	0						+
(E)-2-(Hydroxyimino)-5-methylhexan-3-on (63)										x	-						
(E)-1-(Furan-2-yl)-N-isobutylmethanimin (35)												x	0				
(E)-1-(Furan-2-yl)-N-isopentylmethanimin (36)																	
(E)-2-((Isobutylimino)methyl)phenol (37)					+		+					x	-				
(E)-2-((Isopentylimino)methyl)phenol (38)																	
(E)-N-Isobutyl-1-phenylmethanimin (26)			+	x	-		+					x	-				
(E)-N-(2-Methylbutyl)-1-phenylmethanimin (31)												x	0				
(E)-N-Isopentyl-1-phenylmethanimin (34)				x	0							x	0				
(E)-Methyl 2-(cyclohex-2-enyliden)acetat (15)										x	+						
(Z)-Methyl 2-(cyclohex-2-enyliden)acetat (14)																	
N-Isobutylmethansulfonamid (24)			+	x	++	x	0	x	0			x	0			x	0
N-Isopentylmethansulfonamid (25)			+														

Tabelle 22: Veränderungen in den Konzentrationen ausgewählter Metabolite während der Kommunikationsexperimente mit *S. tropica* CNB-440. (x): vom Stamm produziert, (+): erhöhte Konzentration, (-): verringerte Konzentration, (0) keine Produktion.

	CNB-440	CUA-848	Dualkultur	CUA809	Dualkultur	CUA-833	Dualkultur	CUA-796	Dualkultur	CNY-679	Dualkultur
Salinilacton A (16)	x		0		0		0		0	x	+
Salinilacton B (17)	x		0		0		0		0	x	+
Salinilacton C (18)	x		0		0		0		0		++
Salinilacton D (19)											+
Salinilacton E (20)											
Salinilacton F (21)	x		0		0		0		0		+
Salinilacton G (22)	x		0		0		0		0		0
(E)-3-(Hydroxyimino)butan-2-on (59)										x	-
(E)-2-(Hydroxyimino)pentan-3-on (58)	x		0		0		0		0	x	-
(E)-2-(Hydroxyimino)hexan-3-on (60)	x		0		-		-		0	x	-
(E)-2-(Hydroxyimino)-4-methylpentan-3-on (62)										x	0
(E)-2-(Hydroxyimino)-5-methylhexan-3-on (63)	x		0		-		-		-	x	-
(E)-1-(Furan-2-yl)-N-isobutylmethanimin (35)						x	0				
(E)-1-(Furan-2-yl)-N-isopentylmethanimin (36)											
(E)-2-((Isobutylimino)methyl)phenol (37)			+			x	+		+		
(E)-2-((Isopentylimino)methyl)phenol (38)							+				
(E)-N-Isobutyl-1-phenylmethanimin (26)		x	+			x	-		+		
(E)-N-(2-Methylbutyl)-1-phenylmethanimin (31)			+			x	-		+		
(E)-N-Isopentyl-1-phenylmethanimin (34)		x	0			x	0				
(E)-Methyl 2-(cyclohex-2-enyliden)acetat (15)	x		-		-		-		-	x	+
(Z)-Methyl 2-(cyclohex-2-enyliden)acetat (14)	x		-		-		-		-		+
N-Isobutylmethansulfinamid (24)		x	+	x	-	x	-	x	+		
N-Isopentylmethansulfinamid (25)			+								

4. Zusammenfassung und Ausblick

In dieser Arbeit wurden die flüchtigen Naturstoffe der marinen Actinomyceten *S. arenicola* CNS-205 und CNH-643, *S. tropica* CNB-440, *S. pacifica* CNR-114, CNR-894 und CNS-863, *S. fenicalii* CNR-942, *S. cortesiana* CNY-202, *S. vitiensis* CNS-055, *S. mooreana* CNS-237, *S. goodfellowii* CNY-666 und *S. oceanensis* CNT-029, CNT-403 und CNT-854 analysiert.

Im Gasphasenextrakt von *S. arenicola* CNS-205 konnten die vier neuen Naturstoffe (*E*)-2-(Hydroxyimino)pentan-3-on (**58**), (*E*)-2-(Hydroxyimino)hexan-3-on (**60**), (*E*)-2-(Hydroxyimino)-4-methylpentan-3-on (**62**) und (*E*)-2-(Hydroxyimino)-5-methylhexan-3-on (**63**) identifiziert und ihre Struktur durch Synthese bestätigt werden (Abbildung 65). Die Verbindungen traten in unterschiedlichen Mengen und Zusammensetzungen in allen weiteren analysierten *Salinispora*-Bakterien auf. Ausnahmen bildeten *S. mooreana* CNS-237 und *S. pacifica* CNS-863.

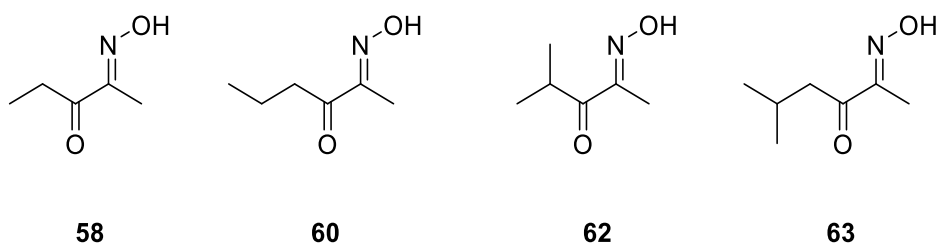


Abbildung 65: Strukturen der neuen Oxime aus *Salinispora*-Bakterien.

In der Analyse von *S. cortesiana* CNY-202 wurden die unbekannten Verbindungen **N-R** gefunden. Davon konnte **Q** als 2-Hydroxy-3-methoxybenzoesäure-methylester (**231**) durch den Vergleich mit einem kommerziell erhältlichen Standard identifiziert werden. Weiterhin wurde die Verbindung in *S. goodfellowii* CNY-666 und das Strukturisomer 2-Hydroxy-5-methoxybenzoesäuremethylester (**102**) in *S. tropica* CNB-440 nachgewiesen. Beide Verbindungen sind als Antifraßmittel gegen den Fichtenrüsselkäfer *Hylobius abietis* bekannt.^[76] Die beiden Verbindungen **O** und **P** weisen Strukturmerkmale von Cyclohexenyl-Derivaten auf und müssen in Zukunft aufgeklärt werden.

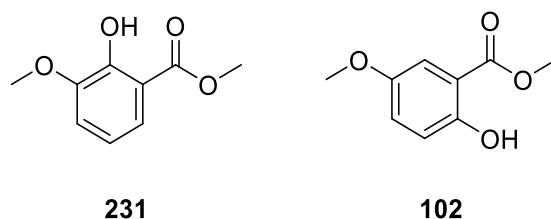


Abbildung 66: Aromatische Methylester aus *S. cortesiana* CNY-202, *S. goodfellowii* CNY-666 und *S. tropica* CNB-440.

Das aus methanotrophen Bakterien bekannte Cyclohexylisothiocyanat (**55**)^[60] konnte in den Gasphasenextrakten von CNS-205, CNY-202, *S. oceanensis* CNT-403 und CNT-854 nachgewiesen werden.

Die Gasphasenanalyse von *S. oceanensis* CNT-403 brachte zudem die unbekannten Verbindungen **B**, **Y**, **Z** und **AA** – **AM** zum Vorschein. Davon konnte **Z** als (*E*)-4,6-Dimethyloct-6-en-3-on (**204**) und **B** als (*Z*)-2,5-Dimethyl-2,4-hexensäuremethylester (**43**) mittels Synthese identifiziert werden. Beide Substanzen stellen neue Naturstoffe dar. Für die unbekannte Verbindung **AM** konnten drei Strukturvorschläge durch Synthese ausgeschlossen werden. Die abschließende Aufklärung steht noch aus. Aufgrund der hohen Anzahl an unbekannten Verbindungen ist CNT-403 ein interessanter Kandidat für die Aufklärung neuer Naturstoffe aus Bakterien.

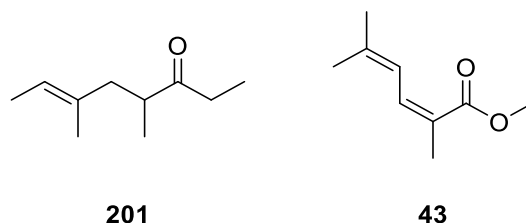


Abbildung 67: Neue bakterielle Naturstoffe aus *S. oceanensis* CNT-403.

Die Analyse von *S. pacifica* CNS-863 führte neben diversen Iminen zur Identifizierung der beiden Sulfinamide **24** und **25** durch Synthese.^[44] Dies ist das erste Mal, dass Sulfinamide als Naturstoffe beschrieben wurden. Weiterhin konnten **24** und **25** auch anderen Bakterien nachgewiesen werden. Bei den Verbindungen handelt es sich daher um weit verbreitete Substanzen. Von den drei neue Iminen **28-30** konnten zudem zwei im Duft von Birnenblüten nachgewiesen werden.^[37] Darüber hinaus konnte durch chirale GC die absolute Konfiguration des verzweigten Imins **31** zu (*S,E*)-*N*-(2-Methylbutyl)-1-phenylmethanimin bestimmt werden. Die Übereinstimmung der absoluten Konfiguration mit biogenem L-Isoleucin ist ein weiterer Hinweis für die postulierte Biosynthese aus den natürlichen Aminosäuren.

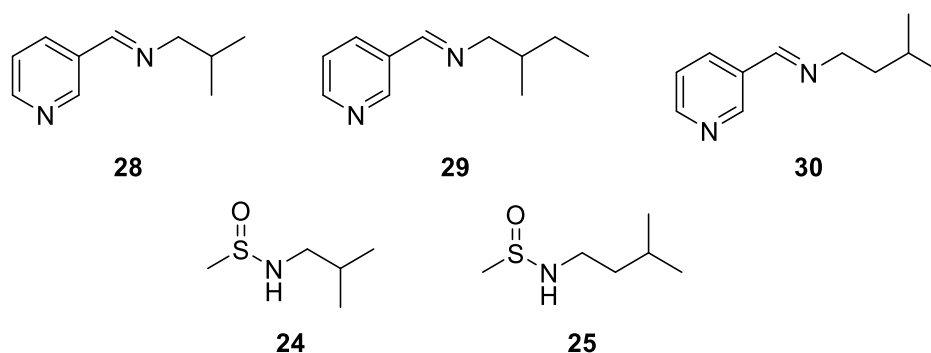


Abbildung 68: Neue Verbindungen aus *S. pacifica* CNS-863.

Im Gasphasenextrakt von CNB-440 wurde das Formamid **39** nachgewiesen, welches aus dem ebenfalls vom Bakterium produzierten Anthranilsäuremethylester (**40**) stammt. Weitere fünf unbekannte Verbindungen wurden durch Gasphasenanalyse in *S. mooreana* CNS-237 gefunden. Trotz HRMS konnten keine Strukturvorschläge für **S-W** gemacht werden.

Im Verlauf dieser Arbeit wurde aus den durchgeführten Analysen eine spezielle Datenbank für bekannte und unbekannte flüchtige Verbindungen aus *Salinispora*-Bakterien erstellt. Die Datenbank erleichtert damit die Auswertung zukünftiger Analysen. Die Identifizierung bisher unbekannter Verbindungen aus dieser Datenbank kann einfach mit älteren GC/MS Analysen verglichen werden und ermöglicht so eine nachträgliche Identifizierung dieser Substanzen. Da viele flüchtige Verbindungen auch von Bakterien außerhalb von *Salinispora* produziert werden, kann die Datenbank auch als Grundlage für Analysen anderer Gattungen genutzt werden.

Die Gasphasenanalyse mittels OSSA und thermischer Desorption (TDU) ermöglichte die Identifizierung sehr flüchtiger Verbindungen in bakteriellen Duftprofilen, die mittels CLSA zuvor nicht möglich war. Durch das Wegfallen von Extraktionsschritten besitzt die Methode zudem einen geringeren Arbeitsaufwand und ermöglicht so eine schnelle Untersuchung mehrerer Replikate. Im Vergleich zur CLSA konnten in dieser Arbeit allerdings weniger flüchtige Verbindungen wie z.B. die Salinilactone nur schlecht bis gar nicht nachgewiesen werden. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass durch eine längere Desorptionszeit dieser Nachteil ausgeglichen werden kann. Somit würde die OSSA eine schnelle Untersuchung nach neuen flüchtigen Naturstoffen ermöglichen. Die CLSA bietet hingegen die Möglichkeit, den erhaltenen Extrakt mehrfach mit verschiedenen analytischen Methoden zu untersuchen. Zudem wird der Eintrag von Verunreinigungen durch das geschlossene System minimiert. Zusätzliche analytische Daten leisten einen großen Beitrag zur Aufklärung unbekannter Verbindungen, da Massenspektren hier allein oftmals nicht ausreichen. Daher werden orthogonale Daten, z.B. aus IR-Spektren, benötigt. Durch GC/DD-FTIR können die komplexen Gasphasenextrakte aufgetrennt und analysiert werden. Aufgrund der flüchtigen Eigenschaften vieler Verbindungen stellt die Messung allerdings weiterhin eine große Herausforderung dar. Beide Methoden, CLSA und OSSA, werden daher benötigt und müssen ergänzend eingesetzt werden.

Mit Hilfe von DAPC konnte gezeigt werden, dass die Entwicklung eines statistischen Modells zur Klassifizierung einzelnen *Salinispora*-Spezies basierend auf den VOCs

möglich ist. Die genetische Verwandtschaft äußert sich demnach deutlich in der Produktion gemeinsamer volatiler Duftstoffe. Durch zusätzliche Analysedaten kann das Modell weiter ausgebaut werden und ermöglicht die Identifizierung charakteristischer Verbindungen für die einzelnen Spezies. Die Methode könnte auch zur Untersuchung der flüchtigen Verbindungen in anderen Mikroorganismen eingesetzt werden. Eine Ausweitung auf weitere Gattungen würde eine Zuordnung verschiedener Arten – basierend auf dem charakteristischen Duftprofil – ermöglichen. Da die Duftprofile allerdings eine hohe Anfälligkeit für veränderte Kultivierungs- und Analysebedingungen besitzt, muss das Modell individuell an die gegebenen Bedingungen angepasst werden.

Durch eine Reihe von Kommunikationsexperimenten wurde weiterhin der Einfluss flüchtiger Verbindungen auf die Bakterien-Bakterien-Interaktion untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass VOCs allein eine Veränderung im Wachstum von Bakterien hervorrufen können. Dabei variierten die Beobachtungen zwischen erhöhtem Wachstum bis zu fast vollständiger Hemmung. Allerdings konnten durch die Analyse der Duftprofile keine Verbindungen identifiziert werden, denen ein Einfluss zugeordnet werden kann. Das Testen jeder einzelnen Substanz war im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich. Die Konzentrationsänderungen charakteristischer Verbindungen wie der Salinilactone und Oxime korrelieren nicht mit den Beobachtungen aus den Wachstumstests. Da die Beurteilung der Wachstumsraten nur rein optisch erfolgte, sollten zukünftig Flüssigkulturen analysiert werden, bei denen das Wachstum über die optische Dichte quantifiziert werden kann. Durch die Abnahme in der Produktion von Salinilactonen und Oximen in den meisten Kommunikationsexperimenten muss die Auswahl einzelner biogener Marker zur Detektion von Bakterien kritisch hinterfragt werden. Die Auswahl einzelner VOCs, wie sie insbesondere von vielen Arbeitsgruppen in der medizinischen Anwendung beschrieben wird, erscheint nicht plausibel.

5. Experimenteller Teil

5.1. Allgemeines

5.1.1. Chemikalien

Kommerziell erhältliche Ausgangsverbindungen wurden von den Firmen Merck, TCI und Thermo Fischer Scientific bezogen und ohne zusätzliche Reinigung verwendet. Technische Lösungsmittel wurden vor Gebrauch destilliert. Reaktionen mit luft- oder wasserempfindlichen Substanzen wurden in ausgeheizten Glasapparaturen und mit nach Standardmethoden getrockneten Lösungsmitteln unter Stickstoffatmosphäre durchgeführt.

5.1.2. Dünnschicht- und Säulenchromatographie

Dünnschichtchromatographie wurde an Kieselgel beschichteten Folien des Typs Polygram® SIL G/UV254 (Macherey-Nagel, Schichtdicke 0.2 mm) durchgeführt. Die Detektion erfolgte mit UV-Licht (254 nm), wässriger basischer Kaliumpermanganat-Lösung, 10%iger ethanolischer Molybdätophosphorsäure, Ninhydrin in Butanol/2.5% Essigsäure oder ethanolischer Vanillin-Lösung als Anfärbereagenz. Säulenchromatographische Trennungen wurden an Kieselgel M60 (0.04 – 0.063 mm, 230 – 400 mesh ASTM, Macherey-Nagel) bei Überdruck mit dem angegebenen Laufmittel durchgeführt.

5.1.3. NMR-Spektroskopie

NMR-Spektren wurden mit den Geräten AV III HD 300 (300 MHz für ^1H , 75 MHz für ^{13}C), DRX-400 (400 MHz für ^1H , 100 MHz für ^{13}C), AV III HD 500 (500 MHz für ^1H , 125 MHz für ^{13}C), AV III-400 (400 MHz für ^1H , 100 MHz für ^{13}C) und AV II-600 (600 MHz für ^1H , 150 MHz für ^{13}C) der Firma Bruker bei 300 K aufgenommen. Die chemische Verschiebung ist in ppm relativ zum internen Standard Tetramethylsilan (TMS, $\delta = 0$ ppm) und die Kopplungskonstante J in Hertz (Hz) angegeben. Die Signalmultiplizitäten der Protonen werden mit Singulett (s), Duplett (d), Triplett (t), Quartett (q), Quintett (quint), Sextett (sext), Septett (sept) oder Multiplet (m) angegeben. Die Konnektivitäten der Kohlenstoffatome werden mit primär (CH_3), sekundär (CH_2), tertiär (CH) oder quartär (C_q) angegeben.

5.1.4. Gaschromatographie/Massenspektrometrie

GC/MS-Messungen von Syntheseproben erfolgten mit einer GC HP6890/MSD HP5973 Kombination der Firma Hewlett-Packard sowie einer GC 8860/MSD 5977B

Kombination der Firma Agilent. Die Injektion erfolgte im Split-Modus bei folgenden Temperaturprogrammen: Starttemperatur 50 °C (5 min isotherm), Heizrate 10 °C/min, Endtemperatur 320 °C sowie Starttemperatur 50 °C (5 min isotherm), Heizrate 20 °C/min, Endtemperatur 320 °C. Naturproben und Extrakte wurden auf einer GC 7890B/MSD 5977A, sowie auf einer GC 7890A/MSD 59775 Kombination der Firma Agilent gemessen. Die Injektion erfolgte Splittless bei folgendem Temperaturprogramm: Starttemperatur 50 °C (5 min isotherm), Heizrate 5 °C/min, Endtemperatur 320 °C. Die Erzeugung der Massenspektren erfolgte durch Elektronenstoß-Ionisation (EI) mit einer Energie von 70 eV. Die Gaschromatographische Trennung erfolgte an Fused-Silica Kapillarsäulen des Typs HP-5MS (Agilent, 30 m × 0.25 mm Innendurchmesser (I.D.) × d_f 0.25 µm). Als Trägergas wurde Helium verwendet. Retentionsindizes wurden eines homologen Alkanrasters (C₇-C₄₀) bestimmt. Die Angabe von Massenzahlen m/z erfolgt in u, die relative Intensität wird in Prozent (%) angegeben. Chirale Gaschromatographie wurde an einem Gaschromatographen 7890A der Firma Agilent unter Verwendung einer β-DEX™ 225 Kapillarsäule (Merck, 30 m × 0.25 mm I.D. × d_f 0.25 µm) durchgeführt. Die Identifizierung der Substanzen erfolgte durch den Vergleich der Massenspektren mit diversen Bibliotheken (Wiley 7, NIST 05/17) und einer eigenen, durch synthetische Standards erzeugten Bibliothek, sowie den Vergleich der Retentionsindices mit Literaturwerten oder denen von Syntheseproben.

Hochaufgelöste Massenspektrometriedaten wurden mit einem GC 6890 der Firma Agilent, ausgestattet mit einer ZB1-MS Kapillarsäule (Phenomenex, 30 m × 0.25 mm I.D. × d_f 0.25 µm) und gekoppelt an ein time-of-flight Massenspektrometer JMS-T100GC (GCAccuTOF, JEOL) aufgenommen. Die Injektion erfolgte im Split-Modus mit Helium als Trägergas. Die Ionisation erfolgte bei 70 eV im EI-Verfahren. Zur Auswertung wurde die JEOL MassCenter™ Workstation Software benutzt. Das System wurde mit PFK kalibriert um eine Auflösung von 6000 (FWHM) bei $m/z = 292.9824$ zu erreichen.

5.1.5. IR-Spektroskopie

IR-Spektren wurden mit einem GC 7890B der Firma Agilent gekoppelt an ein DiscovIR DD-FTIR-Interface der Firma Dani Instruments in der Festphase aufgenommen. Zur Trennung wurde eine HP5-MS Kapillarsäule (Agilent, 30 m × 0.25 mm I.D. × d_f 0.25 µm) mit Helium als Trägergas verwendet. Die eluierten Proben wurden auf einer ZnSe-

Scheibe bei -40 °C bei einer Rotationsgeschwindigkeit von 4 mm/min aufgetragen. Die resultierenden IR-Spektren hatten eine Auflösung von 4 Wellenzahlen und wurden normalisiert und verarbeitet mit einer GRAMS/AI 9.2 Software der Firma Thermo Fisher Scientific. Die Lage der Absorptionsbanden wird als Energie in cm^{-1} angegeben.

5.2. Kultivierung von Bakterienkulturen

5.2.1. Ansetzen von Medien

Zur Kultivierung der Bakterien wurde A1 Medium (4 g/L Hefeextrakt, 2 g/L Bacto Pepton, 10 g/L Stärke, 30 g/L Instant Ocean) verwendet. Die Sterilisation erfolgte in einem Autoklav. Zur Herstellung von Agar-Platten wurde dem Medium vor der Sterilisation 10 g/L Agar-Agar, Kobe I hinzugefügt. Das noch heiße Medium wurde in Petrischalen gefüllt und bis zur Erstarrung stehen gelassen.

5.2.2. Ansetzen von Bakterienkulturen

Für Flüssigkulturen wurden zunächst 50 mL Vorkulturen des jeweiligen Bakteriums angesetzt. Nach drei Tagen wurden die Hauptkulturen (100 mL) durch Zugabe von einem Mililiter der Vorkultur angeimpft und für sieben Tage bei 28 °C auf den Schüttler gestellt. Für Plattenkulturen wurden die Bakterien zunächst mit der 9-Strichmethode ausgestrichen und bei 28 °C im Brutschrank kultiviert. Von diesen wurde mit Hilfe einer in der Flamme sterilisierten Impföse eine Kolonie gepickt und großflächig auf einer neuen Agar-Platte ausgestrichen. Die Kultivierung erfolgte bei 28 °C im Brutschrank. Ein ausreichendes Wachstum ist nach drei bis sieben Tagen erreicht.

5.2.3. Extraktion von flüchtigen Bakterienverbindungen

Zur Extraktion der flüchtigen Verbindungen wurden UniSolv® Lösungsmittel der Firma Merck verwendet. Der Aktivkohlefilter wird dreimal mit 20 μL Dichlormethan extrahiert und das Extrakt mittels GC/MS analysiert. Der Filter wird im Anschluss je dreimal mit Pentan, Methanol und Dichlormethan gespült und im Trockenschrank getrocknet. Für die Thermal Desorption Unit (TDU) wurden ausschließlich Tenax® TA Filter der Firma Gerstel verwendet, die zuvor in einem geheizten Stickstoffstrom konditioniert wurden.

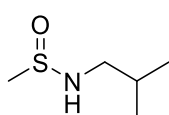
5.3. Statistische Auswertung

Die Auswertung der aufgenommenen Daten erfolgte Mittels der Software AMDIS^[120] und Metabolite Detector (MD)^[121]. Der Abgleich der Massenspektren erfolgte mit der NIST Datenbank^[26] und einer eigenen, aus über 1300 Einträgen bestehenden Datenbank mit bekannten und unbekannten bakteriellen VOCs, die im Zuge dieser

Arbeit erstellt wurde. Für den MD wurden die Grundeinstellungen für ein Agilent 6890 GC/5975B MS verwendet.^[132] Zur Identifizierung wurde eine *Target*-Analyse mit einem kombinierten Wert aus Spektralähnlichkeit und RI-Übereinstimmung von mind. 0.7 gewählt. Zusätzlich wurde ein „*Cutoff-Score*“ von 0.05% der Peakfläche bezüglich des Gesamtintegrals verwendet. Verbindungen mit einem Retentionsindex >2300 wurden nicht mehr als VOC gewertet und anschließend aussortiert. Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des Programms R^[122] sowie der Pakete *adeqenet*^[128] und *MASS*^[133]. Das verwendete Script ist im Anhang zu finden.

5.4. Synthesen

5.4.1. *N*-Isobutylmethanesulfinamid (**24**)



Dimethyldisulfid (0.38 mL, 4.25 mmol, 1.00 Äq.) wurde zusammen mit Eisessig (0.49 mL, 8.49 mmol, 2.00 Äq.) auf -20 °C gekühlt. Daraufhin wurde frisch dest. Sulfurylchlorid (0.27 mL, 3.40 mmol, 0.80 Äq.) tropfenweise zur gefrorenen Lösung hinzugefügt und weitere 30 min bei -20 °C gerührt. Die Reaktionslösung wurde langsam auf Raumtemperatur erwärmt und für weitere 2 h gerührt. Das Rohprodukt wurde unter vermindertem Druck eingeeengt und das entstandene gelbe Sulfinylchlorid wurde mit 42 mL CH₂Cl₂ verdünnt. Anschließend wurde Isobutylamin (1.20 mL, 12.0 mmol, 2.80 Äq.) langsam zur Reaktionslösung gegeben und für 18 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionslösung wurde danach mit ges. NaHCO₃-Lösung, dest. H₂O und ges. NaCl-Lösung gewaschen, die org. Phase über MgSO₄ getrocknet und das CH₂Cl₂ unter vermindertem Druck entfernt. Das Produkt **24** wurde nach säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel (EtOAc) als farblose Flüssigkeit erhalten (39.0 mg, 0.30 mmol, 7%).

Durchführung nach Literaturvorschrift.^[47]

RI: 1143;

¹H NMR (MeOD, 300 MHz) δ [ppm] = 2.99–2.72 (m, 2H), 2.63 (s, 3H), 1.75 (hept, J = 6.7 Hz, 1H), 0.94 (dd, J = 6.7, 1.6 Hz, 6H);

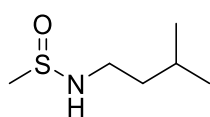
¹³C NMR (MeOD, 76 MHz) δ [ppm] = 51.07, 41.00, 30.55, 20.47, 20.42;

IR (Festphase): ν_{\max} [cm⁻¹] = 3184, 2957, 2926, 2871, 1733, 1712, 1523, 1470, 1415, 1386, 1367, 1301, 1252, 1176, 1052, 979, 949;

EIMS m/z (%): 135 (22), 120 (99), 92 (62), 77 (6), 76 (9), 64 (36), 63 (24), 57 (100), 43 (20), 41 (55);

HREIMS m/z 135.07375 (berechnet für $C_5H_{13}NOS$: 135.07178).

5.4.2. *N*-Isopentylmethanesulfinamid (**25**)



Dimethyldisulfid (0.09 mL, 1.06 mmol, 1.00 Äq.), Isopentylamin (0.27 mL, 2.34 mmol, 2.20 Äq.) und NH_4PF_6 (173 mg, 1.06 mmol, 1.00 Äq.) wurden in 2.8 mL eines 1:3 DMSO/Wasser Gemisch gelöst.

CuI (20.0 mg, 0.11 mmol, 0.10 Äq.) und 2,2'-Bipyridin (bpy, 17 mg, 0.11 mmol, 0.10 Äq.) wurden anschließend hinzugefügt. Die Reaktion wurde bei 80 °C für 18 h unter Luftatmosphäre (Ballon) gerührt. Im Anschluss wurde das Rohprodukt mit Diethylether verdünnt, mit dest. H_2O und ges. NaCl-Lösung gewaschen und die org. Phase über $MgSO_4$ getrocknet. Säulenchromatographische Reinigung an Kieselgel (Pentan/Diethylether 1:1) liefert das Produkt **25** als farblose Flüssigkeit (27 mg, 0.08 mmol, 8%).

Durchführung nach Literaturvorschrift.^[48]

RI: 1251;

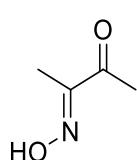
1H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) δ [ppm] = 3.68 (t, J = 5.9 Hz, 1H), 3.22–3.05 (m, 2H), 2.61 (s, 3H), 1.65 (hept, J = 6.7 Hz, 1H), 1.53–1.35 (m, 2H), 0.92 (d, J = 6.6 Hz, 6H);

^{13}C NMR ($CDCl_3$, 76 MHz) δ [ppm] = 41.99, 40.73, 39.57, 25.75, 22.40;

IR (Festphase): ν_{max} [cm^{-1}] = 3173, 2957, 2930, 2871, 1470, 1413, 1385, 1367, 1302, 1135, 1059, 991, 962, 881;

EIMS m/z (%): 136 (4), 135 (6), 134 (83), 132 (42), 92 (29), 78 (6), 77 (6), 72 (5), 71 (84), 64 (12), 63 (18), 55 (10), 47 (7), 43 (100), 41 (28).

5.4.3. (*E*)-2-(Hydroxyimino)butan-3-on (**59**)



Hydroxylamin Hydrochlorid (73 mg, 1.05 mmol, 1.00 Äq.) wurde in 0.5 mL H_2O gelöst und bei 0 °C mit einer 1 M wässrigen NaOH-Lösung (1.74 mL, 1.66 Äq.) versetzt. Im Anschluss wurde 2,3-Butandion (**48**, 0.09 mL, 1.05 mmol, 1.00 Äq.) hinzugeetropt und für 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Der bei der Reaktion entstandene Niederschlag wurde mit wenig dest. H_2O gelöst und die Reaktionslösung 2x mit Diethylether extrahiert. Die vereinigten org. Phasen wurden über $MgSO_4$ getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem

Druck entfernt. Das Produkt **59** wurde nach säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel (Pentan/Diethylether 10:1) als weißer Feststoff erhalten (43 mg, 0.42 mmol, 40%).

RI: 961;

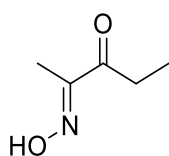
¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ [ppm] = 8.68 (s, 1H, OH), 2.39 (s, 3H, CH₃), 1.99 (s, 3H, CH₃);

¹³C NMR (CDCl₃, 76 MHz) δ [ppm] = 197.07 (C=O), 157.23 (C=N), 25.09 (CH₃), 8.04 (CH₃);

IR (Festphase): ν_{\max} [cm⁻¹] = 3321, 2984, 2944, 2893, 1705, 1485, 1446, 1381, 1327, 1177, 1125, 1093, 1049, 950, 883, 848, 803;

EIMS m/z (%): 102 (2), 101 (37), 86 (1), 58 (7), 44 (3), 43 (100), 42 (14), 41 (5), 40 (3), 39 (1).

5.4.4. (*E*)-2-(Hydroxyimino)pentan-3-on (**58**)



Hydroxylamin Hydrochlorid (69 mg, 1.00 mmol, 1.00 Äq.) wurde in 0.5 mL H₂O gelöst und bei 0 °C mit einer 1.0 M wässrigen NaOH-Lösung (1.66 mL, 1.66 Äq.) versetzt. Im Anschluss wurde 2,3-Pentandion (0.10 mL, 1.00 mmol, 1.00 Äq.) hinzuge tropft und für 2 h bei

Raumtemperatur gerührt. Der bei der Reaktion entstandene Niederschlag wurde mit wenig dest. H₂O gelöst und die Reaktionslösung 2x mit Diethylether extrahiert. Die vereinigten org. Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Produkt **58** wurde nach säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel (Pentan/Diethylether 10:1) als farblose Flüssigkeit erhalten (57 mg, 0.50 mmol, 50%).

RI: 1051;

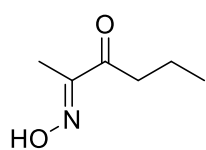
¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ [ppm] = 8.78 (s, 1H, OH), 2.81 (q, J = 7.4 Hz, 2H, CH₂), 1.99 (s, 3H, CH₃), 1.11 (t, J = 7.4 Hz, 3H, CH₃);

¹³C NMR (CDCl₃, 76 MHz) δ [ppm] = 199.79 (C=O), 156.53 (C=N), 30.53 (CH₂), 8.25 (CH₃), 8.01 (CH₃);

IR (Festphase): ν_{\max} [cm⁻¹] = 3296, 3205, 3081, 3050, 2924, 2884, 1672, 1456, 1420, 1365, 1320, 1130, 1026, 983, 939, 772;

EIMS m/z (%): 115 (4), 99 (1), 98 (23), 87 (19), 86 (9), 69 (2), 58 (16), 57 (100), 56 (12), 55 (4), 54 (1), 53 (1), 43 (2), 42 (29), 41 (7), 40 (4), 39 (2);

HREIMS m/z 115.06342 (berechnet für C₅H₉NO₂: 115.06333).

5.4.5. (*E*)-2-(Hydroxyimino)hexan-3-on (**60**)

Hydroxylamin Hydrochlorid (55 mg, 0.79 mmol, 0.90 Äq.) wurde mit wasserfreiem Natriumacetat (73 mg, 0.89 mmol, 1.02 Äq.) in 1 mL Ethanol vorgelegt und mit 2,3-Hexandion (**61**) (0.11 mL, 0.88 mmol, 1.00 Äq.) versetzt. Die Reaktion wurde für 20 h bei Raumtemperatur gerührt und im Anschluss mit CH_2Cl_2 verdünnt und mit dest. H_2O gewaschen. Die organische Phase wurde über MgSO_4 getrocknet und überschüssiges Ethanol unter vermindertem Druck entfernt. Das Produkt **60** wurde nach säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel (Pentan/Diethylether 10:1) als farblose Flüssigkeit erhalten (58 mg, 0.46 mmol, 58%).

RI: 1142;

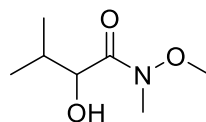
$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz) δ [ppm] = 8.70 (s, OH, 1H), 2.76 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H), 2.00 (s, 3H), 1.65 (tq, $J = 7.1, 7.5$ Hz, 2H), 0.94 (t, $J = 7.4$ Hz, 3H);

$^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 76 MHz) δ [ppm] = 199.30 (C=O), 156.83 (C=N), 39.18 (CH_2), 17.66 (CH_2), 13.78 (CH_3), 8.21 (CH_3);

IR (Festphase): ν_{max} [cm^{-1}] = 3307, 3246, 2965, 2878, 1674, 1457, 1405, 1253, 1049, 1017, 948, 892, 747;

EIMS m/z (%): 113 (1), 112 (16), 86 (9), 70 (8), 69 (2), 68 (7), 54 (2), 45 (1), 44 (4), 43 (100), 42 (10), 41 (8), 39 (4);

HREIMS m/z 129.07754 (berechnet für $\text{C}_6\text{H}_{11}\text{NO}_2$: 129.07898).

5.4.6. Synthese von (*E*)-2-(Hydroxyimino)-4-methylpentan-3-on (**62**)5.4.6.1. 2-Hydroxy-*N*-methoxy-*N*,3-dimethylbutanamid (**68**)

Valin (**64**, 1.00 g, 8.54 mmol, 1.00 Äq.) wurde zusammen mit 19 mL 0.5 M H_2SO_4 bei 0 °C vorgelegt und mit NaNO_2 (1.18 g, 17.1 mmol, 2.00 Äq.) versetzt. Die Reaktion wurde über 18 h auf Raumtemperatur erwärmt und im Anschluss 3x mit EtOAc extrahiert. Die org. Phase wurde mit dest. H_2O und ges. NaCl-Lösung gewaschen und über MgSO_4 getrocknet. Überschüssiges Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und die entstandene Hydroxycarbonsäure direkt weiter umgesetzt.

Das Rohprodukt wurde in 38 mL Methanol gelöst und mit 0.1 mL konz. H_2SO_4 versetzt. Im Anschluss wurde für 3 h unter Rückfluss erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde Methanol unter vermindertem Druck entfernt und das Produkt erneut in Diethylether

gelöst. Die organische Phase wurde mit ges. NaHCO_3 -Lösung und ges. NaCl -Lösung gewaschen und über MgSO_4 getrocknet. Überschüssiges Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der Methylester **66** zusammen mit *N,O*-Dimethylhydroxylamin Hydrochlorid (1.29 g, 13.3 mmol, 1.55 Äq.) in 28 mL Diethylether gelöst und mit Hilfe eines Kryostats auf $-20\text{ }^\circ\text{C}$ gekühlt. Isopropylmagnesiumchlorid-Lösung (2.0 M, 12.8 mL, 25.7 mmol, 3.00 Äq.) wurde über 30 min zur Reaktionslösung gegeben und dann für 45 min bei $0\text{ }^\circ\text{C}$ gerührt. Die Reaktion wurde anschließend durch die Zugabe von 10 mL ges. NH_4Cl -Lösung und 6 mL dest. H_2O beendet und 3x mit Diethylether extrahiert. Die vereinigten org. Phasen wurden mit ges. NaCl -Lösung gewaschen und über MgSO_4 getrocknet. Das Produkt **68** wurde nach säulenchromatographischer Reinigung (Pentan/EtOAc 7:3) als farblose Flüssigkeit erhalten (452 mg, 2.87 mmol, 33% über drei Stufen).

Durchführung nach Literaturvorschrift.^[134]

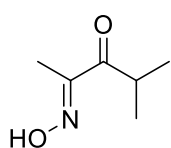
^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz) δ [ppm] = 4.27 (s, 1H), 3.71 (s, 3H), 3.25 (s, 3H), 2.03 (m, 1H), 1.05 (d, $J = 6.9\text{ Hz}$, 3H), 0.82 (d, $J = 6.8\text{ Hz}$, 3H);

^{13}C NMR (CDCl_3 , 76 MHz,) δ [ppm] = 174.53, 72.74, 61.10, 31.25, 19.53, 15.21;

EIMS (66) m/z (%): 103 (2), 91 (2), 90 (53), 89 (4), 85 (2), 83 (1), 75 (6), 74 (4), 73 (100), 72 (6), 71 (2), 69 (1), 62 (2), 61 (4), 59 (5), 58 (7), 57 (10), 56 (2), 55 (39), 53 (2), 45 (11), 44 (1), 43 (24), 42 (3), 41 (15), 40 (2), 39 (11), 38 (1), 33 (12);

EIMS (68) m/z (%): 133 (7), 119 (1), 118 (21), 90 (5), 89 (1), 88 (2), 83 (1), 74 (2), 73 (28), 72 (1), 62 (8), 61 (100), 60 (9), 59 (2), 58 (14), 57 (5), 56 (3), 55 (28), 53 (1), 46 (16), 45 (11), 44 (1), 43 (14), 42 (3), 41 (8), 39 (6), 33 (3).

5.4.6.2. (*E*)-2-(Hydroxyimino)-4-methylpentan-3-on (**62**)



Das Weinreb-Amid **68** (200 mg, 1.24 mmol, 1.00 Äq.) wurde in 12 mL Diethylether bei $0\text{ }^\circ\text{C}$ vorgelegt und eine 3.0 M Methylmagnesiumbromid-Lösung (1.74 mL, 5.21 mmol, 4.20 Äq.) langsam hinzuge tropft. Im Anschluss wurde die Reaktion über 18 h auf Raumtemperatur erwärmt. Die Reaktionslösung wurde mit wenig ges. NH_4Cl -Lösung versetzt und 4x mit CH_2Cl_2 extrahiert. Die vereinigten org. Phasen werden mit ges. NaCl -Lösung gewaschen, über MgSO_4 getrocknet und überschüssiges Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das entstandene Hydroxyketon **70** wurde ohne weitere Aufarbeitung in 2 mL EtOAc gelöst und mit IBX (1.04 g, 3.72 mmol, 3.00 Äq.) versetzt. Die Reaktion wurde für 4 h unter Rückfluss erhitzt. Nach dem Abkühlen auf

Raumtemperatur wird der Feststoff abfiltriert und mit wenig Diethylether gewaschen. Der Diethylether wurde unter vermindertem Druck entfernt und das gelbliche Rohprodukt aufgrund seiner hohen Flüchtigkeit sofort weiter umgesetzt. Das Diketon **72** wurde zusammen mit Hydroxylamin Hydrochlorid (94.8 mg, 1.37 mmol, 1.10 Äq.) und wasserfreiem Natriumacetat (104 mg, 1.27 mmol, 1.02 Äq.) in 1.6 mL Ethanol gelöst und für 48 h bei Raumtemperatur gerührt. Im Anschluss wurde mit CH₂Cl₂ verdünnt und mit dest. H₂O gewaschen. Die org. Phase wurde über MgSO₄ getrocknet und überschüssiges Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Produkt **62** wurde nach säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel (Pentan/EtOAc 95:5 → 85:15) erhalten (28.3 mg, 0.22 mmol, 18% über drei Stufen).

Durchführung nach Literaturvorschriften.^[135,136]

RI: 1095;

¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ [ppm] = 8.68 (s, 1H, OH), 3.60 – 3.42 (m, 1H, CH), 2.00 (s, 3H, CH₃), 1.11 (d, *J* = 6.9 Hz, 6H, 2x CH₃);

¹³C NMR (CDCl₃, 76 MHz,) δ [ppm] = 203.02 (C=O), 155.59 (C=N), 34.46 (CH), 18.77 (2x CH₃), 8.50 (CH₃);

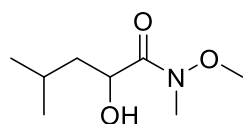
IR (Festphase): ν_{max} [cm⁻¹] = 3309, 2978, 2877, 1670, 1447, 1383, 1268, 1096, 1018, 935, 864;

EIMS *m/z* (%): 129 (1), 114 (4), 113 (2), 112 (29), 97 (3), 96 (1), 95 (3), 94 (2), 87 (3), 86 (10), 84 (2), 83 (2), 73 (4), 72 (2), 71 (35), 70 (26), 69 (4), 68 (1), 67 (2), 58 (12), 57 (3), 55 (3), 44 (4), 43 (100), 42 (61), 41 (31), 40 (5), 39 (9), 38 (2);

HREIMS *m/z* 154.14379 (berechnet für C₁₀H₁₈O: 154.13576).

5.4.7. Synthese von (*E*)-2-(Hydroxyimino)-5-methylpentan-3-on (**63**)

5.4.7.1. 2-Hydroxy-*N*-methoxy-*N*,4-dimethylpentanamid (**69**)



Leucin (**65**, 1.00 g, 7.62 mmol, 1.00 Äq.) wurde zusammen mit 17 mL 0.5 M H₂SO₄ bei 0 °C vorgelegt und mit NaNO₂ (1.05 g, 15.2 mmol, 2.00 Äq.) versetzt. Die Reaktion wurde über 18 h auf

Raumtemperatur erwärmt und im Anschluss 3x mit EtOAc extrahiert. Die org. Phase wurde mit dest. H₂O und ges. NaCl-Lösung gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Überschüssiges Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und die entstandene Hydroxycarbonsäure direkt weiter umgesetzt.

Das Rohprodukt wurde in 38 mL Methanol gelöst und mit 0.1 mL konz. H₂SO₄ versetzt. Im Anschluss wurde für 3 h unter Rückfluss erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde Methanol unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt erneut in Diethylether gelöst. Die org. Phase wurde mit ges. NaHCO₃-Lösung und ges. NaCl-Lösung gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Überschüssiges Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der Methylester **67** zusammen mit *N,O*-Dimethylhydroxylamin Hydrochlorid (1.15 g, 11.8 mmol, 1.55 Äq.) in 16 mL THF gelöst und mit Hilfe eines Kryostats auf -20 °C gekühlt. Isopropylmagnesiumchlorid-Lösung (2.0 M, 11.4 mL, 22.9 mmol, 3.00 Äq.) wurde über 30 min zur Reaktionslösung gegeben und dann für 45 min bei 0 °C gerührt. Die Reaktion wurde anschließend durch die Zugabe von 20 mL ges. NH₄Cl-Lösung und 12 mL dest. H₂O beendet und 3x mit Diethylether extrahiert. Die vereinigten org. Phasen wurden mit ges. NaCl-Lösung gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Das Produkt **69** wurde nach säulenchromatographischer Reinigung (Pentan/EtOAc 7:3) als farblose Flüssigkeit erhalten (462 mg, 2.64 mmol, 35% über drei Stufen).

Durchführung nach Literaturvorschrift.^[134]

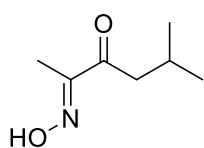
¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ [ppm] = 4.42 (t, *J* = 8.1 Hz, 1H, CH), 3.72 (s, 3H, OCH₃), 3.24 (s, 3H, NCH₃), 1.95 (tsept, *J* = 6.6, 1.6 Hz, 1H, CH), 1.51 – 1.38 (m, 2H), 0.96 (t, *J* = 6.8 Hz, 6H, 2x CH₃).

¹³C NMR (CDCl₃, 76 MHz,) δ [ppm] = 186.00, 67.32, 61.24, 44.03, 24.63, 23.60, 21.29.

EIMS (67) *m/z* (%): 127 (1), 113 (4), 103 (1), 101 (3), 99 (1), 90 (22), 89 (4), 88 (4), 87 (66), 86 (3), 85 (3), 81 (2), 76 (1), 75 (2), 71 (12), 70 (7), 69 (100), 68 (2), 67 (2), 61 (4), 59 (10), 58 (3), 57 (12), 56 (1), 55 (7), 53 (4), 51 (1), 45 (31), 44 (10), 43 (58), 42 (5), 41 (34), 40 (2), 39 (15), 38 (1), 33 (10);

EIMS (69) *m/z* (%): 147 (3), 119 (4), 118 (10), 90 (1), 89 (1), 88 (2), 87 (4), 71 (2), 70 (1), 69 (21), 68 (1), 62 (5), 61 (100), 60 (7), 59 (2), 58 (8), 57 (4), 56 (1), 55 (2), 53 (2), 46 (11), 45 (14), 44 (4), 43 (23), 42 (3), 41 (15), 39 (6), 33 (2).

5.4.7.2. (*E*)-2-(Hydroxyimino)-5-methylpentan-3-on (**63**)



Das Weinreb-Amid **69** (164 mg, 0.94 mmol, 1.00 Äq.) wurde in 9 mL Diethylether bei 0 °C vorgelegt und eine 3.0 M Methylmagnesiumbromid-Lösung (1.31 mL, 3.93 mmol, 4.20 Äq.) langsam hinzugetropft. Im Anschluss wurde die Reaktion über 18 h auf Raumtemperatur erwärmt. Die Reaktionslösung wurde mit wenig ges. NH₄Cl-Lösung versetzt und 4x mit

CH₂Cl₂ extrahiert. Die vereinigten org. Phasen wurden anschließend mit ges. NaCl-Lösung gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und überschüssiges Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das entstandene Hydroxyketon **71** wurde ohne weitere Aufarbeitung in 1 mL EtOAc gelöst und mit IBX (787 mg, 2.81 mmol, 3.00 Äq.) versetzt. Die Reaktion wurde für 4 h unter Rückfluss erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde der Feststoff über Kieselgel abfiltriert und mit wenig Diethylether gewaschen. Überschüssiger Diethylether wurde unter vermindertem Druck entfernt und das gelbliche Rohprodukt aufgrund seiner hohen Flüchtigkeit sofort weiter umgesetzt. Das Diketon **73** wurde zusammen mit Hydroxylamin Hydrochlorid (45.5 mg, 0.66 mmol, 0.70 Äq.) und wasserfreiem Natriumacetat (52.2 mg, 0.64 mmol, 0.68 Äq.) in 0.8 mL Ethanol gelöst und für 48 h bei Raumtemperatur gerührt. Im Anschluss wurde mit CH₂Cl₂ verdünnt und die Reaktionslösung mit dest. H₂O gewaschen. Die organische Phase wurde über MgSO₄ getrocknet und überschüssiges Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Produkt **63** bedurfte keiner weiteren Reinigung (79 mg, 0.55 mmol, 59% über 3 Stufen).

Durchführung nach Literaturvorschriften.^[135,136]

RI: 1190;

¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ [ppm] = 2.67 (d, *J* = 7.0 Hz, 2H), 2.27 – 2.11 (m, 1H), 2.00 (s, 3H), 0.94 (d, *J* = 6.7 Hz, 6H);

¹³C NMR (CDCl₃, 76 MHz,) δ [ppm] = 199.10 (C=O), 157.06 (C=NOH), 46.06 (CH₂), 25.13 (CH), 22.62 (2xCH₃), 8.21 (CH₃);

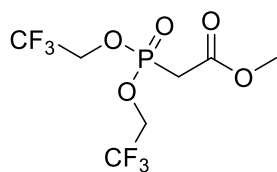
IR (Festphase): ν_{\max} [cm⁻¹] = 3316, 2959, 2932, 2873, 1670, 1629, 1468, 1452, 1368, 1053, 1018, 935, 710;

EIMS (71**)** *m/z* (%): 111 (2), 99 (2), 97 (3), 88 (2), 87 (42), 86 (6), 85 (7), 74 (19), 73 (3), 71 (8), 70 (7), 69 (92), 58 (4), 57 (15), 45 (39), 43 (100), 41 (31), 39 (5);

EIMS (73**)** *m/z* (%): 128 (8), 86 (3), 85 (44), 72 (1), 69 (2), 67 (1), 58 (5), 57 (100), 55 (3), 53 (2), 51 (1), 50 (1), 44 (4), 43 (88), 42 (12), 41 (55), 40 (3), 39 (17), 38 (2);

EIMS (63**)** *m/z* (%): 143 (3), 128 (2), 127 (3), 126 (35), 111 (2), 110 (2), 109 (1), 108 (1), 101 (7), 98 (4), 96 (1), 87 (6), 86 (14), 85 (50), 84 (2), 83 (2), 82 (3), 81 (1), 73 (2), 69 (4), 67 (1), 58 (18), 57 (100), 56 (7), 55 (6), 54 (2), 53 (3), 51 (1), 44 (2), 43 (22), 42 (48), 41 (47), 40 (6), 39 (18), 38 (2).

5.4.8. 2-(Bis(2,2,2-trifluoroethoxy)phosphoryl)essigsäuremethylester (44b)



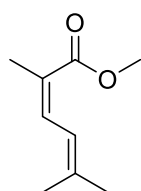
Trimethylphosphonoacetat (**44**, 1.33 mL, 8.24 mmol, 1.00 Äq.) wurde bei 0 °C mit PCl_5 (3.43 g, 16.5 mmol, 2.00 Äq.) versetzt und 1 h bei Raumtemperatur und im Anschluss 3 h bei 75 °C gerührt. Entstehende Nebenprodukte wurden laufend während der Reaktion bei 50 °C im Hochvakuum abdestilliert. Der Rückstand wurde in 8 mL Toluol gelöst und mit einer Lösung aus Trifluorethanol (1.20 mL, 16.5 mmol, 2.00 Äq.) und *N,N*-Diisopropylethylamin (2.87 mL, 16.5 mmol, 2.00 Äq.) in 12 mL Toluol versetzt. Die Reaktionslösung wurde für 18 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde wenig Kieselgel zugegeben und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der feste Rückstand wurde anschließend säulenchromatographisch an Kieselgel (EtOAc/Pentan 7:3) gereinigt. Das Produkt **44b** wurde als farblose Flüssigkeit erhalten (628 mg, 1.97 mg, 24%).

Durchführung nach Literaturvorschriften.^[55]

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz) δ [ppm] = 4.46 (m, 4H), 3.78 (s, 3H), 3.21 (s, 1H), 3.13 (s, 1H);

EIMS m/z (%): 318 (2), 289 (1), 288 (7), 287 (100), 286 (2), 267 (14), 261 (2), 260 (25), 259 (1), 258 (1), 257 (19), 245 (5), 244 (2), 240 (4), 255 (3), 219 (14), 187 (4), 177 (3), 176 (2), 165 (2), 163 (5), 162 (2), 161 (4), 143 (1), 142 (1), 129 (3), 127 (2), 119 (2), 115 (1), 113 (4), 107 (5), 105 (2), 99 (2), 97 (3), 83 (6), 81 (3), 80 (1), 77 (6), 74 (2), 69 (3), 67 (1), 64 (3), 61 (5), 59 (3), 51 (1), 47 (2), 45 (2), 43 (2), 42 (8).

5.4.9. (*Z*)-2,5-Dimethyl-2,4-hexensäuremethylester (**43**)



Die Phosphoryl-Spezies **44b** (628 mg, 1.97 mmol, 1.00 Äq) wurde in 2 mL DMSO vorgelegt und bei 0 °C mit *t*-BuOK (222 mg, 1.97 mmol, 1.00 Äq.) versetzt und so lange bei Raumtemperatur gerührt, bis sich der Feststoff vollständig gelöst hat. Im Anschluss wurde Methyljodid (0.11 mL, 1.78 mmol, 0.90 Äq.) hinzugegeben und weiter für 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Danach wurde die Reaktionslösung auf ges. NH_4Cl -Lösung gegossen und 3x mit Diethylether extrahiert. Die vereinigten org. Phasen wurden mit ges. NaCl -Lösung gewaschen, über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt (712 mg) enthält eine Mischung aus Monomethylierter- (**44c**)

und Dimethylierter-Spezies (**44d**) im Verhältnis 1.6:1. Da die Dimethylierte-Spezies im nachfolgenden Syntheseschritt nicht reagieren kann, wurde auf eine weitere Aufarbeitung verzichtet und das Rohprodukt direkt weiter umgesetzt.

Das Produktgemisch wurde zusammen mit 18-Krone-6-Ether (343 mg, 1.30 mmol, 0.66 Äq.) in 6.5 mL THF gelöst und bei 0 °C mit zuvor in Hexan gewaschenem KH (149 mg, 1.30 mmol, 0.66 Äq., 35% in Mineralöl) versetzt. Nach 20 min rühren bei 0 °C wurde die Reaktion auf -78 °C gekühlt und mit 3-Methyl-2-butenal (**46**, 0.12 mL, 1.30 mmol, 1.00 Äq.) versetzt. Nach weiteren 30 min wurde die Reaktion durch die Zugabe von ges. NH₄Cl-Lösung beendet und 3x mit Diethylether extrahiert. Die vereinigten org. Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und überschüssiges Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Nach säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel (Pentan/EtOAc 50:1) konnte eine Reinfraction des Produkts **43** als farblose Flüssigkeit isoliert werden (20 mg, 0.13 mmol, 7% über zwei Stufen). Das (Z)/(E)-Verhältnis 54:46 wurde mittels GC bestimmt.

Durchführung nach Literaturvorschrift. [55,56]

RI: 1188;

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ [ppm] = 6.93 – 6.84 (m, 1H), 6.73 – 6.64 (m, 1H), 3.76 (s, 3H), 1.98 (s, 3H), 1.87 (s, 3H), 1.82 (s, 3H);

¹³C NMR (CDCl₃, 101 MHz) δ [ppm] = 168.45 (C=O), 142.65 (C_q), 136.37 (CH), 122.93 (C_q), 122.34 (CH), 51.23 (OCH₃), 26.78 (CH₃), 20.99 (CH₃), 18.12 (CH₃);

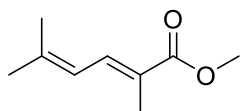
IR (Festphase): ν_{max} [cm⁻¹] = 3063, 3026, 2991, 2951, 2928, 2913, 2861, 2742, 1710, 1635, 1600, 1444, 1435, 1377, 1324, 1242, 1205, 1157, 1121, 1045, 1011, 905, 872, 821, 770;

EIMS (**44c**) *m/z* (%): 332 (3), 303 (1), 302 (9), 301 (100), 300 (16), 288 (4), 287 (16), 282 (2), 281 (20), 277 (2), 275 (1), 274 (13), 273 (46), 272 (1), 261 (5), 260 (75), 258 (3), 257 (38), 254 (1), 253 (3), 246 (8), 245 (15), 233 (13), 230 (2), 229 (2), 226 (2), 225 (17), 205 (3), 203 (3), 201 (1), 197 (1), 193 (3), 190 (2), 177 (16), 175 (3), 174 (2), 173 (7), 165 (7), 163 (26), 162 (2), 161 (12), 147 (2), 146 (2), 143 (6), 141 (2), 127 (6), 125 (2), 123 (2), 121 (1), 119 (2), 117 (2), 115 (5), 113 (6), 107 (2), 105 (3), 103 (1), 99 (6), 97 (6), 95 (2), 93 (7), 91 (9), 90 (1), 89 (1), 88 (3), 87 (27), 83 (12), 81 (7), 80 (3), 79 (2), 77 (3), 73 (2), 71 (2), 70 (1), 69 (6), 67 (3), 65 (2), 64 (10), 61 (7), 59 (14), 57 (2), 56 (8), 55 (20), 51 (2), 47 (4), 45 (5), 43 (1), 41 (1), 33 (7);

EIMS (43) m/z (%): 154 (44), 140 (12), 139 (100), 124 (4), 123 (28), 111 (5), 107 (13), 97 (3), 96 (8), 95 (54), 94 (15), 93 (17), 91 (11), 80 (7), 79 (44), 78 (6), 77 (24), 67 (24), 65 (7), 59 (5), 55 (16), 53 (13), 51 (8), 50 (3), 43 (9), 41 (13), 39 (13);

HREIMS m/z 154.09816 (berechnet für $C_9H_{14}O_2$, 154.09938).

5.4.10. (*E*)-2,5-Dimethyl-2,4-hexensäuremethylester (**41**)



Das Bromid **42** (600 mg, 3.59 mmol, 1.00 Äq.) wurde zusammen mit Triethylphosphit (0.62 mL, 3.59 mmol, 1.00 Äq.) bei 150 °C für 2 h unter Rückfluss erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde das Rohprodukt in 2 mL DME gelöst und zu einer Suspension aus NaH (89.0 mg, 3.69 mmol, 1.00 Äq., 60% in Paraffinöl) in 4 mL DME gegeben und für 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Im Anschluss wurde eine Lösung aus 3-Methyl-2-butenal (**46**, 0.33 mL, 3.39 mmol, 0.94 Äq.) in 1 mL DME tropfenweise hinzugegeben und für 1 h gerührt. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von Methanol beendet und mit dest. H_2O gewaschen. Überschüssiges Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das Produkt **41** nach säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel (Pentan/EtOAc 50:1) erhalten (356 mg, 2.31 mmol, 64% über zwei Stufen).

Durchführung nach Literaturvorschrift.^[53,54]

RI: 1223;

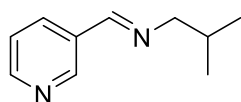
1H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) δ [ppm] = 7.54 – 7.35 (m, 1H), 6.23 – 6.04 (m, 1H), 3.76 (s, 3H), 1.92 (s, 3H), 1.90 (s, 3H), 1.89 (s, 3H);

^{13}C NMR ($CDCl_3$, 76 MHz) δ [ppm] = 169.42 (C=O), 144.49 (C_q), 134.62 (CH), 124.33 (C_q), 121.12 (CH), 51.67 (OCH_3), 26.89 (CH_3), 18.85 (CH_3), 12.34 (CH_3);

EIMS m/z (%): 155 (5), 154 (49), 140 (10), 139 (100), 137 (1), 125 (2), 124 (4), 123 (29), 122 (7), 121 (2), 108 (2), 107 (13), 96 (6), 95 (51), 94 (15), 93 (16), 92 (1), 91 (9), 80 (6), 79 (42), 78 (4), 77 (21), 67 (24), 66 (2), 65 (5), 63 (2), 55 (15).

5.4.11. Vorschrift für allgemeine Iminsynthese

Der Aldehyd (1.00 Äq.) wird mit 3 Å Molekularsieb in Toluol (0.1 M) vorgelegt und im Anschluss das Amin (1.00 Äq.) hinzugetropft. Die Reaktion wird für 18 h unter Rückfluss erhitzt. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wird die Reaktionslösung über Celite gefiltert und mit CH_2Cl_2 gewaschen. Das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck entfernt und liefert das Produkt in ausreichender Reinheit.^[44]

5.4.11.1. (*E*)-*N*-Isobutyl-1-(pyridin-3-yl)methanimin (**28**)

Das Imin **28** wurde nach der allgemeinen Vorschrift 6.3.9 unter Verwendung von Nicotinaldehyd (0.09 mL, 0.93 mmol, 1.00 Äq.) und Isobutylamin (0.09 mL, 0.93 mmol, 1.00 Äq.) in 9 mL Toluol hergestellt. Das Produkt wurde als leicht gelbe Flüssigkeit erhalten (150 mg, 0.92 mmol, 99%).

RI: 1331;

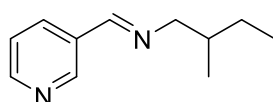
¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ [ppm] = 8.86 (dd, *J* = 2.2, 0.9 Hz, 1H), 8.64 (ddd, *J* = 4.8, 1.8, 0.5 Hz, 1H), 8.28 (ddt, *J* = 1.5, 1.0, 0.5 Hz, 1H), 8.12 (ddd, *J* = 7.9, 2.2, 1.7 Hz, 1H), 7.38 – 7.30 (m, 1H), 3.46 (ddd, *J* = 6.6, 1.4, 0.5 Hz, 2H), 2.02 (ddd, *J* = 13.2, 6.8, 6.3 Hz, 1H), 0.97 (dd, *J* = 6.7, 0.5 Hz, 6H);

¹³C NMR (CDCl₃, 76 MHz) δ [ppm] = 157.81 (N=CH), 151.23 (Ar-CH), 150.12 (Ar-CH), 134.39 (Ar-CH), 131.83 (C_q), 123.59 (Ar-CH), 69.90 (CH₂), 29.51 (CH), 20.61 (2x CH₃);

IR (Festphase): ν_{max} [cm⁻¹] = 3282, 3087, 3032, 2957, 2928, 2898, 2870, 2826, 1650, 1591, 1574, 1469, 1421, 1374, 1325, 1026, 853, 823, 805, 710;

EIMS *m/z* (%): 162 (5), 161 (11), 147 (2), 135 (6), 134 (4), 121 (2), 120 (22), 119 (100), 118 (6), 112 (1), 107 (3), 106 (7), 105 (4), 97 (1), 93 (6), 92 (62), 91 (4), 84 (11), 80 (6), 79 (2), 78 (3), 77 (1), 66 (1), 65 (10), 64 (3), 63 (3), 55 (2), 52 (2), 51 (2), 43 (1), 41 (5), 39 (3);

HREIMS *m/z* 161.11008 (berechnet für [M-H]⁺ C₁₀H₁₃N₂: 161.10787).

5.4.11.2. (*E*)-*N*-(2-Methylbutyl)-1-(pyridin-3-yl)methanimin (**29**)

Das Imin **29** wurde nach der allgemeinen Vorschrift 6.3.9 unter Verwendung von Nicotinaldehyd (0.22 mL, 2.33 mmol, 1.00 Äq.) und 2-Methylbutylamin (0.32 mL, 2.23 mmol, 1.00 Äq.) in 23 mL Toluol hergestellt. Das Produkt wurde als leicht gelbe Flüssigkeit erhalten (404 mg, 2.30 mmol, 99%).

RI: 1438;

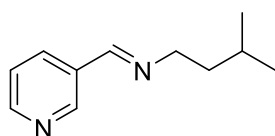
¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ [ppm] = 8.86 (dd, *J* = 2.2, 0.8 Hz, 1H), 8.64 (dd, *J* = 4.8, 1.7 Hz, 1H), 8.30 – 8.26 (m, 1H), 8.11 (dt, *J* = 7.9, 2.0 Hz, 1H), 7.34 (dddd, *J* = 7.9, 4.9, 0.9, 0.5 Hz, 1H), 3.81 – 3.30 (m, 2H), 1.87 – 1.74 (m, 1H), 1.55 – 1.40 (m, 1H), 1.33 – 1.13 (m, 1H), 1.00 – 0.91 (m, 6H);

¹³C NMR (CDCl₃, 76 MHz,) δ [ppm] = 157.86 (N=CH), 151.29 (Ar-CH), 150.19 (Ar-CH), 134.36 (Ar-CH), 131.86 (C_q), 123.60 (Ar-CH), 68.13 (CH₂), 35.97 (CH), 27.50 (CH₂), 17.72 (CH₃), 11.42 (CH₃);

IR (Festphase): ν_{\max} [cm^{-1}] = 3280, 3087, 3052, 3032, 2960, 2928, 2874, 2853, 1649, 1591, 1573, 1463, 1420, 1379, 1324, 1026, 853, 809, 710;

EIMS m/z (%): 176 (4), 175 (12), 162 (1), 161 (11), 148 (2), 147 (11), 134 (2), 133 (7), 132 (1), 121 (4), 120 (35), 119 (100), 117 (1), 107 (4), 106 (4), 105 (6), 99 (2), 98 (31), 97 (2), 93 (6), 92 (55), 91 (4), 80 (6), 79 (2), 78 (3), 66 (1), 65 (8), 64 (3), 63 (3), 55 (1), 52 (1), 51 (2), 43 (2), 41 (5), 39 (3).

5.4.11.3. (*E*)-*N*-Isopentyl-1-(pyridin-3-yl)methanimin (**30**)



Das Imin **30** wurde nach der allgemeinen Vorschrift 6.3.9 unter Verwendung von Nicotinaldehyd (0.09 mL, 0.93 mmol, 1.00 Äq.) und Isopentylamin (0.11 mL, 0.93 mmol, 1.00 Äq.) in 9 mL Toluol hergestellt. Das Produkt wurde als leicht gelbe Flüssigkeit erhalten (164 mg, 0.92 mmol, 98%).

RI: 1443;

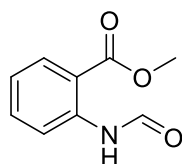
^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz) δ [ppm] = 8.85 (dd, J = 2.2, 0.9 Hz, 1H), 8.64 (dd, J = 4.8, 1.7 Hz, 1H), 8.36 – 8.28 (m, 1H), 8.16 – 8.05 (m, 1H), 7.34 (dddd, J = 7.9, 4.8, 0.9, 0.5 Hz, 1H), 3.72 – 3.60 (m, 2H), 1.80 – 1.64 (m, 1H), 1.65 – 1.55 (m, 2H), 0.95 (d, J = 6.4 Hz, 6H);

^{13}C NMR (CDCl_3 , 76 MHz,) δ [ppm] = 157.70 (N=CH), 151.32 (Ar-CH), 150.16 (Ar-CH), 134.30 (Ar-CH), 131.87 (C_q), 123.60 (Ar-CH), 60.12 (CH_2), 39.83 (CH_2), 25.99 (CH), 22.56 (2x CH_3);

IR (Festphase): ν_{\max} [cm^{-1}] = 3280, 3087, 3052, 3032, 2959, 2927, 2874, 2851, 1649, 1591, 1573, 1464, 1420, 1380, 1324, 1026, 808, 710;

EIMS m/z (%): 176 (4), 175 (14), 162 (2), 161 (12), 148 (2), 147 (8), 146 (1), 134 (3), 133 (24), 132 (5), 131 (2), 130 (3), 121 (6), 120 (44), 119 (100), 118 (5), 117 (2), 107 (6), 106 (14), 105 (14), 104 (1), 99 (3), 98 (42), 97 (2), 93 (6), 92 (42), 91 (3), 80 (8), 79 (3), 78 (5), 77 (1), 66 (1), 65 (9), 64 (3), 63 (3), 55 (2), 53 (1), 52 (2), 51 (3), 43 (5), 42 (1), 41 (5), 39 (4).

5.4.12. 2-Formamidobenzoessäuremethylester (**39**)



Anthranilsäuremethylester (**40**, 155 mg, 1.03 mmol, 1.00 Äq.) wurde zusammen mit Ameisensäure (0.66 mL, 17.4 mmol, 17.0 Äq.) in 3.4 mL Toluol für 3 h unter Rückfluss erhitzt. Im Anschluss wurde das Toluol

unter vermindertem Druck aus der Reaktionslösung entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch an Kieselgel (Pentan/EtOAc 1:4) gereinigt. Produkt **39** wurde als weißer Feststoff erhalten (183 mg, 1.02 mmol, 99%).

Durchführung nach Literaturvorschrift.^[137]

RI: 1558;

¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ [ppm] = 10.98 (s, 1H, NH), 8.71 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 8.52 (d, J = 1.9 Hz, 1H), 8.05 (dd, J = 8.0, 1.7 Hz, 1H), 7.56 (td, J = 8.2, 1.7 Hz, 1H), 7.13 (td, J = 7.7, 1.2 Hz, 1H), 3.94 (s, 3H, OCH₃);

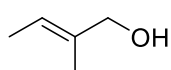
¹³C NMR (CDCl₃, 76 MHz,) δ [ppm] = 168.45 (C=O), 159.45 (CHO), 140.37 (C-NH), 134.65 (Ar-C), 130.83 (Ar-C), 123.09 (Ar-C), 121.15 (Ar-C), 115.14 (C_q), 52.38 (OCH₃);

IR (Festphase): ν_{\max} [cm⁻¹] = 3300, 3274, 3119, 3027, 2955, 2901, 2848, 2793, 1702, 1680, 1606, 1590, 1512, 1450, 1408, 1319, 1294, 1262, 1231, 1208, 1165, 1134, 1085, 1049, 965, 884, 865, 836, 759;

EIMS m/z (%): 180 (4), 179 (34), 152 (5), 151 (59), 148 (10), 147 (3), 146 (15), 130 (2), 121 (2), 120 (20), 119 (100), 93 (4), 92 (35), 91 (7), 90 (8), 77 (4), 66 (2), 65 (13), 64 (7), 63 (5), 52 (3), 50 (1), 39 (4), 38 (1).

5.4.13. Synthese von (*E*)-4,6-Dimethyloct-6-en-3-on (**204**)

5.4.13.1. (*E*)-2-Methylbut-2-en-1-ol (**52**)



Lithiumaluminiumhydrid (777 mg, 20.5 mmol, 2.05 Äq.) wurde in 2 mL Diethylether vorgelegt und bei 0 °C mit Tiglinsäure (**116**, 1.00 g, 10.0 mmol, 1.00 Äq.) versetzt. Danach wurde die Reaktionslösung für 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach erneuter Kühlung auf 0 °C wurde mit Diethylether verdünnt und die Reaktion durch die aufeinander folgende Zugabe von 0.3 mL dest. H₂O, 0.3 mL 15%iger wässriger NaOH-Lösung und erneut 1 mL dest. H₂O beendet. Der Feststoff wurde über Celite abfiltriert und 3x mit Diethylether gewaschen. Die org. Phase wurde mit 1 M wässriger HCl-Lösung, ges. wässriger NaHCO₃-Lösung und ges. wässriger NaCl-Lösung gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Überschüssiges Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der Alkohol **52** nach säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel (Pentan/Diethylether 10:1) als farblose Flüssigkeit erhalten (238 mg, 1.60 mmol, 16%).

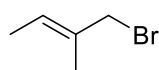
Durchführung nach Literaturvorschrift.^[138]

^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ [ppm] = 5.56 – 5.41 (m, 1H), 3.99 (s, 2H), 1.68 – 1.65 (m, 3H), 1.62 (dh, J = 6.7, 1.1 Hz, 3H);

^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz,) δ [ppm] = 135.43 (C_q), 120.44 (CH), 68.86 (CH_2), 13.26 (CH_3), 13.00 (CH_3);

EIMS m/z (%): 87 (3), 86 (47), 85 (4), 83 (2), 72 (5), 71 (100), 70 (2), 69 (5), 68 (20), 67 (29), 66 (2), 65 (5), 61 (1), 58 (6), 57 (16), 56 (4), 55 (19), 54 (6), 53 (36), 52 (4), 51 (10), 50 (7), 49 (2), 45 (6), 44 (3), 43 (54), 42 (7), 41 (49), 40 (9), 39 (34), 38 (5), 37 (2).

5.4.13.2. (*E*)-1-Bromo-2-methyl-2-buten (**205**)



Der Alkohol **52** (170 mg 1.97 mmol, 1.00 Äq.) wurde in 2 mL Diethylether bei 0 °C vorgelegt und tropfenweise mit Phosphortribromid (0.09 mL, 0.99 mmol, 0.50 Äq.) versetzt. Im Anschluss wurde für 1 h bei Raumtemperatur gerührt und danach die Reaktion durch die Zugabe von dest. H_2O beendet. Nach der Separation der Phasen wurde die wässrige Phase 3x mit Diethylether extrahiert. Die vereinigten org. Phasen wurden mit ges. NaHCO_3 -Lösung und ges. NaCl -Lösung gewaschen und über MgSO_4 getrocknet. Überschüssiges Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Das Bromid **205** wurde als farblose Flüssigkeit erhalten und bedurfte keiner weiteren Aufarbeitung (176 mg, 1.18 mmol, 60%).

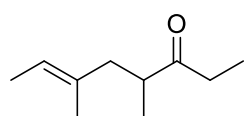
Durchführung nach Literaturvorschrift.^[138]

^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ [ppm] = 5.69 (q, J = 6.8 Hz, 1H), 3.98 (s, 2H), 1.76 (s, 1H), 1.64 (d, J = 6.9 Hz, 3H);

^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz,) δ [ppm] = 132.68 (C_q), 125.78 (CH), 41.81 (CH_2), 14.30 (CH_3), 13.87 (CH_3);

EIMS m/z (%): 150 (12), 148 (13), 95 (1), 93 (1), 82 (1), 81 (3), 80 (1), 79 (2), 70 (6), 69 (100), 68 (4), 67 (11), 66 (1), 65 (3), 63 (2), 62 (1), 55 (1), 54 (7), 53 (17), 52 (4), 51 (8), 50 (6), 49 (1), 43 (3), 42 (4), 41 (83), 40 (6), 39 (29), 38 (5), 37 (2).

5.4.13.3. (*E*)-4,6-Dimethyloct-6-en-3-on (**204**)



Diisopropylamin (0.18 mL, 1.29 mmol, 1.21 Äq.) wurde in 11 mL THF gelöst und auf -78 °C gekühlt. Anschließend wurde *n*-BuLi (0.11 mL, 1.18 mmol, 1.10 Äq., 1.6 M) hinzugegeben und für 30 min bei -78 °C gerührt. Danach wurde die Reaktionslösung auf Raumtemperatur

erwärmt und für weitere 10 min gerührt. Im Anschluss wurde erneut auf -78 °C gekühlt und nacheinander 3-Pentanon (0.11 mL, 1.07 mmol, 1.00 Äq.) und das Bromid **205** (175 mg, 1.18 mmol, 1.10 Äq.) hinzugegeben. Die Reaktion wurde bei -40 °C für 12 h gerührt und anschließend durch die Zugabe von ges. Ammoniumcarbonat-Lösung beendet. Es wurde 3x mit Diethylether extrahiert, die vereinigten org. Phasen mit ges. NaCl-Lösung gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Überschüssiges Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch an Kieselgel (Pentan/EtOAc 10:1) gereinigt. Das Keton **204** wurde als farblose Flüssigkeit erhalten (69.8 mg, 0.45 mmol, 42%).

RI: 1117;

¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ [ppm] = 5.26 – 5.14 (m, 1H), 2.77 – 2.63 (m, 2H), 2.44 (qd, J = 7.3, 1.0 Hz, 2H), 2.32 (ddt, J = 13.8, 6.9, 1.3 Hz, 1H), 1.94 (ddt, J = 13.6, 7.9, 0.9 Hz, 1H), 1.62 – 1.53 (m, 1H), 1.03 (t, J = 7.2 Hz, 3H), 1.01 (d, J = 6.9 Hz, 3H);

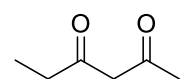
¹³C NMR (CDCl₃, 76 MHz,) δ [ppm] = 215.28 (C=O), 132.89 (C_q), 121.02 (CH=), 44.28 (CH), 43.32 (CH₂), 34.35 (CH₂), 16.15 (CH₃), 15.50 (CH₃), 13.39 (CH₃), 7.71 (CH₃);

IR (Festphase): ν_{\max} [cm⁻¹] = 3061, 3028, 2974, 2936, 2876, 1714, 1672, 1458, 1411, 1375, 1277, 1210, 1110, 1023, 977, 804;

EIMS m/z (%): 155 (2), 154 (17), 139 (8), 137 (2), 136 (14), 126 (6), 125 (64), 121 (3), 110 (1), 107 (10), 106 (2), 105 (1), 99 (2), 98 (8), 97 (88), 96 (13), 93 (2), 87 (2), 86 (36), 82 (2), 81 (12), 80 (1), 79 (5), 69 (52), 68 (2), 67 (11), 58 (2), 57 (87), 56 (7), 55 (100), 54 (2), 53 (7), 42 (3), 41 (33), 39 (9);

HREIMS m/z 154.14379 (berechnet für C₁₀H₁₈O: 154.13576).

5.4.14. 2,4-Hexandion (**217**)



NaH (704 mg, 35.2 mmol, 2.00 Äq., 60% in Paraffinöl) wurde in 17 mL trockenem Diethylether vorgelegt und unter Rühren mit Ethylacetat (1.74 mL, 17.6 mmol, 1.00 Äq.) versetzt. Anschließend wurde 2-Butanon (**216**, 1.58 mL, 17.6 mmol, 1.00 Äq.) gelöst in 3 mL Diethylether langsam zur Reaktionslösung getropft und für 2 h unter Rückfluss erhitzt. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 20 mL dest. H₂O beendet, mit verd. HCl neutralisiert und 3x mit Diethylether extrahiert. Die vereinigten org. Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und überschüssiges Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (Pentan/Diethylether 15:1) gereinigt.

217 wurde als leicht gelbliche Flüssigkeit erhalten (721 mg, 6.12 mmol, 36%). Das Produkt liegt größtenteils in der Enol-Form vor.

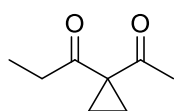
Durchführung nach Literaturvorschrift.^[139]

¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ [ppm] = 15.44 (s, 1H, OH), 5.50 (s, 1H, CH), 2.31 (q, J = 7.5 Hz, 2H, CH₂), 2.06 (s, 3H, CH₃), 1.14 (t, J = 7.5 Hz, 3H, CH₃);

¹³C NMR (CDCl₃, 76 MHz,) δ [ppm] = 195.35, 190.95, 99.05, 31.40, 24.86, 9.61;

EIMS m/z (%): 115 (3), 114 (39), 100 (1), 99 (17), 86 (6), 85 (100), 84 (1), 71 (2), 69 (4), 67 (1), 58 (1), 57 (16), 55 (5), 53 (3), 51 (1), 45 (1), 44 (2), 43 (63), 42 (6), 41 (9), 40 (1), 39 (7), 38 (2).

5.4.15. 1-(1-Acetylcyclopropyl)-propan-1-on (**214**)



Das β -Diketon **217** (200 mg, 1.75 mmol, 1.00 Äq.) wurde zusammen mit K₂CO₃ (485 mg, 3.5 mmol, 2.00 Äq.) in 17.5 mL DMSO vorgelegt und mit 1,2-Dibromethan (329 mg, 1.75 mmol, 1.00 Äq.) versetzt. Das

Reaktionsgemisch wurde für 18 h bei Raumtemperatur gerührt und anschließend mit ges. NH₄Cl-Lösung versetzt und 3x mit wenig Diethylether extrahiert. Die vereinigten org. Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und überschüssiges Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (Pentan/Diethylether 10:1) gereinigt. **214** wurde als leicht gelbliche Flüssigkeit erhalten (102 mg, 0.73 mmol, 42%).

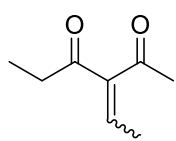
Durchführung nach Literaturvorschrift.^[112]

RI: 1096;

¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ [ppm] = 2.54 (q, J = 7.2 Hz, 2H), 2.22 (s, 3H), 1.44 (s, 4H), 1.08 (t, J = 7.2 Hz, 3H);

¹³C NMR (CDCl₃, 76 MHz,) δ [ppm] = 206.70 (C=O), 204.08 (C=O), 42.76 (C_q), 33.20 (CH₂), 27.76 (CH₃), 17.01 (2x CH₂), 8.20 (CH₃);

EIMS m/z (%): 141 (1), 140 (9), 139 (5), 126 (3), 125 (34), 123 (1), 112 (5), 111 (75), 98 (2), 97 (5), 85 (2), 84 (1), 83 (2), 79 (2), 77 (2), 70 (5), 69 (100), 68 (3), 67 (3), 66 (1), 65 (1), 63 (1), 58 (2), 57 (48), 56 (1), 55 (4), 54 (1), 53 (5), 52 (1), 51 (3), 50 (2), 44 (2), 43 (89), 42 (4), 41 (18), 40 (7), 39 (18), 38 (3), 37 (1).

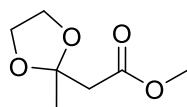
5.4.16. 3-Ethylidenhexan-2,4-dion (**213**)

Das β -Diketon **217** (200 mg, 1.75 mmol, 1.00 Äq.) wurde zusammen mit Acetaldehyd (77 mg, 1.75 mmol, 1.00 Äq.) vorgelegt und im Eisbad auf 0 °C gekühlt. Piperidin (8.7 μ L, 0.09 mmol, 0.05 Äq.) und 0.70 mL Ethanol wurden hinzugesetzt und die Reaktionslösung langsam auf Raumtemperatur erwärmt und für 18 h gerührt. Anschließend wurde die Reaktionslösung mit Diethylether verdünnt, mit dest. H₂O gewaschen und die organische Phase über MgSO₄ getrocknet. Da das Massenspektrum des Rohprodukts nicht mit der gesuchten Verbindung übereinstimmte, wurde auf eine weitere Aufarbeitung verzichtet.

Durchführung nach Literaturvorschrift.^[113]

RI: 1116;

EIMS m/z (%): 140 (9), 125 (16), 112 (3), 111 (51), 97 (4), 83 (5), 79 (6), 77 (3), 70 (7), 69 (100), 68 (4), 67 (3), 57 (32), 56 (3), 55 (4), 53 (5), 43 (61), 41 (13), 39 (15), 38 (4).

5.4.17. 2-(2-Methyl-1,3-dioxolan-2-yl)essigsäuremethylester (**208**)

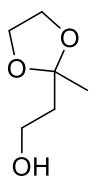
Eine Lösung aus Methylacetoacetat (**207**, 1.85 mL, 17.2 mmol, 1.00 Äq.), Ethylenglycol (9.63 mL, 172 mmol, 10.0 Äq.) und *p*-TsOH (16.4 mg, 0.09 mmol, 0.5 mol%) in 21.5 mL Cyclohexan wurde für 4 h am Wasserabscheider zum Sieden erhitzt. Anschließend wurde die Reaktionslösung mit ges. NaHCO₃-Lsg. und ges. NaCl-Lsg. gewaschen und die org. Phase über MgSO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. **208** wurde in ausreichender Reinheit erhalten, sodass keine weitere Aufarbeitung nötig war. (974 mg, 6.08 mmol, 35%).

Durchführung nach abgewandelter Literaturvorschrift.^[140]

¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ [ppm] = 3.98 (s, 4H, 2xCH₂), 3.70 (s, 3H, CH₃), 2.69 (s, 2H, CH₂), 1.50 (s, 3H, CH₃);

¹³C NMR (CDCl₃, 76 MHz,) δ [ppm] = 169.90 (C_q), 107.56 (C_q), 64.79 (2xCH₂), 51.76 (CH₃), 44.05 (CH₂), 24.43 (CH₃);

EIMS m/z (%): 146 (3), 145 (42), 130 (1), 117 (3), 115 (2), 113 (2), 104 (2), 103 (36), 102 (2), 101 (6), 99 (6), 98 (1), 88 (7), 87 (100), 86 (4), 85 (5), 73 (1), 72 (3), 71 (2), 70 (1), 69 (6), 68 (1), 59 (14), 58 (1), 57 (4), 55 (1), 45 (7), 44 (3), 43 (57), 42 (11), 41 (8), 40 (2), 39 (7).

5.4.18. 6.3.18 2-(2-Methyl-1,3-dioxolan-2-yl)ethan-1-ol (**209**)

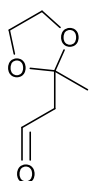
LiAlH₄ (391 mg, 10.3 mmol, 1.00 Äq.) wurde in 15.6 mL THF vorgelegt und in einem Eisbad auf 0 °C gekühlt. Eine Lösung aus **208** (1.65 g, 10.3 mmol, 1.00 Äq.) in 5 mL THF wurde anschließend hinzuge tropft und für 1.5 h bei 0 °C weitergerührt. Die Reaktionslösung wurde dann für 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Im Anschluss wurde erneut auf 0 °C abgekühlt und mit Diethylether verdünnt. Durch die Zugabe von 0.4 mL dest. H₂O, 0.8 mL 15%iger NaOH und nochmals 1.2 mL dest. H₂O wurde die Reaktion beendet und nach der Zugabe von MgSO₄ erneut für 30 min weitergerührt. Der entstandene Feststoff wurde abfiltriert und der Rückstand unter vermindertem Druck eingeeengt. Nach säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel (Pentan/EtOAc 2:1) wurde **209** als farblose Flüssigkeit erhalten (477 mg, 3.61 mmol, 35%). Es konnten 278 mg an **208** zurückgewonnen werden.

Durchführung nach Literaturvorschriften.^[138,140]

¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ [ppm] = 4.00 (s, 4H), 3.77 (m, 2H), 2.78 (br. s, 1H), 1.96 (m, 2H), 1.37 (s, 3H);

¹³C NMR (CDCl₃, 76 MHz,) δ [ppm] = 110.52 (C_q), 64.53 (2x CH₂), 58.98 (CH₂-OH), 40.25 (CH₂), 23.84 (CH₃);

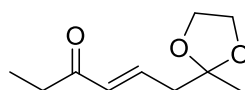
EIMS *m/z* (%): 118 (1), 117 (24), 101 (2), 100 (1), 99 (15), 89 (1), 88 (5), 87 (100), 85 (1), 73 (7), 71 (3), 70 (2), 61 (1), 59 (3), 58 (2), 57 (3), 55 (5), 53 (1), 45 (7), 44 (3), 43 (56), 42 (6), 41 (6), 40 (1), 39 (4).

5.4.19. 2-(2-Methyl-1,3-dioxolan-2-yl)acetaldehyd (**210**)

Der Alkohol **209** (477 mg, 3.61 mmol, 1.00 Äq.) wurden zusammen mit IBX (3.03 g, 10.8 mmol, 3.00 Äq.) in 12 mL EtOAc für 4 h unter Rückfluss erhitzt. Anschließend wurde der Feststoff abfiltriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt (470 mg) bedurfte keinerlei weiterer Aufarbeitung und wurde direkt weiter umgesetzt.

Durchführung nach Literaturvorschrift.^[136]

EIMS *m/z* (%): 116 (1), 115 (27), 88 (5), 87 (99), 86 (3), 72 (1), 71 (10), 70 (3), 69 (4), 61 (1), 59 (8), 58 (3), 57 (3), 55 (3), 45 (11), 44 (4), 43 (100), 42 (12), 41 (14), 40 (3), 39 (9).

5.4.20. (*E*)-6-(2-Methyl-1,3-dioxolan-2-yl)hex-4-en-3-on (**212**)

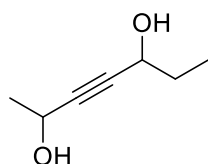
1-Brom-2-butanon (**211**, 200 mg, 1.32 mmol, 1.00 Äq.) wurde zusammen mit Triethylphosphit (220 mg, 1.32 mmol, 1.00 Äq.) bei 150 °C so lange erhitzt, bis kein Rückfluss mehr zu beobachten war. NaH (49.8 mg, 1.25 mmol, 0.94 Äq., 60% in Paraffinöl) wurde in 2.7 mL THF vorgelegt und bei 0 °C mit dem zuvor hergestellten Phosphonsäureester versetzt und für 30 min bei dieser Temperatur gerührt. Im Anschluss wurde der Aldehyd **210** (163 mg, 1.25 mmol, 0.94 Äq.) hinzugegeben und für 1 h bei 0 °C weitergerührt. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von ges. NH₄Cl-Lsg. beendet und die wässrige Phase 3x mit Diethylether extrahiert. Die vereinigten org. Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Produkt **212** wurde nach säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel (Pentan/EtOAc 5:1) als farbloses Öl erhalten (184 mg, 1.00 mmol, 80%).

Durchführung nach Literaturvorschriften.^[53,141]

¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ [ppm] = 6.81 (dt, *J* = 16.0, 7.4 Hz, 1H), 6.16 (dt, *J* = 15.9, 1.4 Hz, 1H), 4.00-3.92 (m, 4H), 2.59 (q, *J* = 7.4 Hz, 2H), 2.55 (dd, *J* = 7.4, 1.1 Hz, 2H), 1.35 (s, 3H), 1.10 (t, *J* = 7.3 Hz);

¹³C NMR (CDCl₃, 76 MHz,) δ [ppm] = 141.47 (CH), 133.38 (CH), 65.29 (2x CH₂), 42.86 (CH₂), 33.57 (CH₂), 24.74 (CH₃), 8.48 (CH₃);

EIMS *m/z* (%): 169 (4), 97 (4), 95 (1), 88 (5), 87 (100), 86 (2), 69 (2), 68 (2), 67 (1), 57 (2), 55 (1), 43 (36), 42 (2), 41 (4), 40 (1), 39 (4).

5.4.21. Hept-3-in-2,5-diol (**218**)

3-Butin-2-ol (**219**, 500 mg, 7.13 mmol, 1.00 Äq.) wurde in 10 mL THF vorgelegt und auf -78 °C gekühlt. Anschließend wurde eine 1.6 M MeLi-Lösung (8.92 mL, 14.3 mmol, 2.00 Äq.) über 20 min hinzugetropft und für eine weitere Stunde in der Kälte gerührt. Danach wurde die Reaktion bei 0 °C für weitere 16 h gerührt und im Anschluss durch die Zugabe von kalter ges. NH₄Cl-Lösung beendet. Die Reaktionslösung wurde mit NaCl gesättigt und 6x mit Diethylether extrahiert und über MgSO₄ getrocknet. Das Diol **218** wurde in ausreichender Reinheit nach entfernen des Lösungsmittels unter vermindertem Druck erhalten (669 mg, 5.22 mmol, 73%).

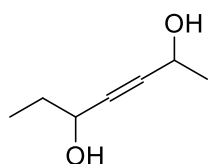
Durchführung nach Literaturvorschrift.^[114]

^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz) δ [ppm] = 4.66 – 4.45 (m, 1H), 4.40 – 4.30 (m, 1H), 1.79 – 1.65 (m, 2H), 1.46 (d, J = 6.5 Hz, 3H), 1.01 (t, J = 7.4 Hz, 3H);

^{13}C NMR (CDCl_3 , 76 MHz,) δ [ppm] = 86.82 (C_q), 84.82 (C_q), 63.61 (CH), 58.26 (CH), 30.77 (CH_2), 24.31 (CH_3), 9.42 (CH_3);

EIMS m/z (%): 113 (3), 110 (6), 109 (3), 100 (3), 99 (56), 98 (1), 97 (3), 96 (3), 95 (41), 94 (7), 93 (3), 91 (13), 86 (1), 85 (12), 84 (7), 83 (12), 82 (8), 81 (86), 80 (2), 79 (17), 78 (3), 77 (22), 75 (1), 74 (2), 72 (2), 71 (37), 70 (4), 69 (7), 68 (3), 67 (22), 66 (7), 65 (15), 64 (2), 63 (9), 62 (5), 61 (3), 59 (3), 58 (6), 57 (47), 56 (5), 55 (30), 54 (7), 53 (68), 52 (7), 51 (17), 50 (10), 49 (2), 45 (11), 44 (7), 43 (100), 42 (6), 41 (37), 40 (5), 39 (29), 38 (6), 37 (3).

5.4.22. Hept-3-en-2,5-diol (**220**)



LiAlH_4 (534 mg, 14.1 mmol, 2.70 Äq.) wurde in 9 mL THF vorgelegt und über 45 min mit einer Lösung aus dem Diol **218** (669 mg, 5.22 mmol, 1.00 Äq.) in THF versetzt, sodass die Temperatur nicht über 25 °C stieg. Danach wurde für 30 min unter Rückfluss erhitzt.

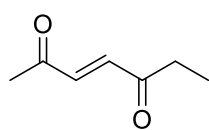
Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurde die Reaktion durch die Zugabe von nacheinander 0.3 mL dest. H_2O , 0.3 mL 15%iger wässriger NaOH -Lösung und nochmals 0.3 mL dest. H_2O beendet und der Feststoff über Celite abfiltriert. Das Produkt **220** wurde in ausreichender Reinheit nach entfernen des Lösungsmittels unter vermindertem Druck erhalten (672 mg, 5.16 mmol, 99%).

Durchführung nach Literaturvorschrift.^[114]

^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz) δ [ppm] = 5.85 – 5.52 (m, 2H), 4.33 (p, J = 6.0 Hz, 1H), 4.03 (p, J = 5.8 Hz, 1H), 1.65 – 1.49 (m, 2H), 1.28 (dd, J = 6.4, 1.3 Hz, 3H), 0.92 (td, J = 7.4, 2.6 Hz, 3H);

^{13}C NMR (CDCl_3 , 76 MHz,) δ [ppm] = 135.44/135.32 (CH), 132.89/132.76 (CH), 74.06/73.94 (CH-OH), 68.66/68.54 (CH-OH), 30.49/30.30 (CH_2), 23.83/23.78 (CH_3), 10.09 (CH_3);

EIMS m/z (%): 112 (8), 101 (9), 99 (1), 97 (8), 96 (4), 95 (2), 94 (6), 93 (1), 91 (2), 86 (5), 85 (8), 84 (4), 83 (59), 82 (1), 80 (1), 79 (16), 78 (2), 77 (9), 75 (8), 73 (3), 72 (3), 71 (10), 70 (4), 69 (14), 68 (3), 67 (8), 66 (2), 65 (5), 63 (2), 62 (1), 59 (14), 58 (5), 57 (83), 56 (7), 55 (80), 54 (5), 53 (16), 52 (3), 51 (6), 50 (4), 45 (11), 44 (3), 43 (100), 42 (5), 41 (31), 40 (4), 39 (26), 38 (3).

5.4.23. Hept-3-en-2,5-dion (**221**)

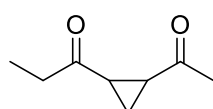
Das Diol **220** (683 mg, 5.25 mmol, 1.00 Äq.) wurde in 17.5 mL EtOAc vorgelegt und mit IBX (4.41 g, 15.7 mmol, 3.00 Äq.) versetzt. Die Reaktion wurde so lange unter Rückfluss erhitzt, bis kein Edukt mehr mittels Dünnschichtchromatographie nachgewiesen werden konnte. Der überschüssige Feststoff wurde anschließend über Celite abfiltriert und überschüssiges EtOAc unter vermindertem Druck entfernt. Säulenchromatographische Reinigung an Kieselgel (Pentan/Diethylether 5:1) lieferte das Produkt **221** als leicht gelbliches Öl (522 mg, 4.10 mmol, 79%).

Durchführung nach Literaturvorschrift.^[136]

¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ [ppm] = 6.84 (s, 2H), 2.70 (q, J = 7.2 Hz, 2H), 2.38 (s, 3H), 1.14 (t, J = 7.2 Hz, 3H);

¹³C NMR (CDCl₃, 76 MHz,) δ [ppm] = 200.98 (C=O), 198.48 (C=O), 136.99 (CH), 136.80 (CH), 34.66 (CH₂), 28.15 (CH₃), 7.61 (CH₃);

EIMS m/z (%): 127 (1), 126 (16), 111 (5), 99 (1), 98 (15), 97 (100), 84 (3), 83 (49), 82 (5), 70 (2), 69 (39), 68 (1), 57 (21), 56 (1), 55 (13), 54 (10), 53 (5), 52 (1), 51 (2), 50 (2), 44 (2), 43 (82), 42 (7), 41 (6), 40 (1), 39 (8), 38 (2), 37 (1).

5.4.24. 1-(2-Acetylcyclopropyl)propan-1-on (**215**)

Natriumhydrid (36.2 mg, 0.91 mmol, 1.10 Äq., 60% in Mineralöl) und Me₃SOI (185 mg, 0.91 mmol, 1.10 Äq.) wurden zusammen vorgelegt und mit tropfenweise 1.7 mL DMSO versetzt. Die Lösung wurde für 1 h bei Raumtemperatur gerührt und anschließend eine Lösung des Diketons **221** (104 mg, 0.82 mmol, 1.00 Äq.) in 1.7 mL DMSO hinzugetropft. Danach wurde für 18 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionslösung wurde mit dest. H₂O verdünnt und 3x mit CH₂Cl₂ extrahiert. Die vereinigten org. Phasen wurden anschließend 2x mit dest. H₂O und einmal mit ges. wässriger NaCl-Lösung gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Das Produkt wurde mittels GC/MS analysiert. Da es sich hierbei nicht um den gesuchten Naturstoff handelte, wurde nicht weiter aufgearbeitet.

Durchführung nach Literaturvorschrift.^[115]

RI: 1114;

EIMS m/z (%): 141(2), 140 (19), 125 (4), 112 (8), 111 (100), 97 (3), 84 (1), 83 (23), 82 (1), 79 (1), 69 (4), 68 (2), 67 (2), 65 (1), 57 (19), 55 (17), 54 (1), 53 (4), 51 (2), 50 (1), 44 (2), 43 (79), 42 (4), 41 (7), 40 (3), 39 (13), 38 (2), 37 (1).

6. Verzeichnisse

6.1. Literaturverzeichnis

- [1] L. J. Rothschild, R. L. Mancinelli, *Nature* **2001**, 409, 1092.
- [2] a) J. Clardy, M. A. Fischbach, C. T. Walsh, *Nat. Biotechnol.* **2006**, 24, 1541; b) S. I. Elshahawi, K. A. Shaaban, M. K. Kharel, J. S. Thorson, *Chem. Soc. Rev.* **2015**, 44, 7591; c) J. S. Zarins-Tutt, T. T. Barberi, H. Gao, A. Mearns-Spragg, L. Zhang, D. J. Newman, R. J. M. Goss, *Nat. Prod. Rep.* **2016**, 33, 54; d) M. P. Doyle, L. R. Steenson, J. Meng in *The Prokaryotes* (Hrsg.: E. Rosenberg, E. F. DeLong, S. Lory, E. Stackebrandt, F. Thompson), Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, **2013**, S. 241–256; e) O. O. Babalola, *Biotechnol. Lett.* **2010**, 32, 1559.
- [3] T. Hartmann, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **2008**, 105, 4541.
- [4] S. Schulz, J. S. Dickschat, *Nat. Prod. Rep.* **2007**, 24, 814.
- [5] N. N. Gerber, *J. Chem. Ecol.* **1977**, 3, 475.
- [6] M. Kai, U. Effmert, M. C. Lemfack, B. Piechulla, *Sci. Rep.* **2018**, 8.
- [7] S. Westhoff, G. P. van Wezel, D. E. Rozen, *Curr. Opin. Microbiol.* **2017**, 36, 95.
- [8] K. Schulz-Bohm, L. Martín-Sánchez, P. Garbeva, *Front. Microbiol.* **2017**, 8.
- [9] S. Schulz, J. S. Dickschat, B. Kunze, I. Wagner-Dobler, R. Diestel, F. Sasse, *Mar. Drugs* **2010**, 8, 2976.
- [10] N. C. Reading, V. Sperandio, *FEMS Microbiol. Lett.* **2006**, 254, 1.
- [11] S. Létoffé, B. Audrain, S. P. Bernier, M. Delepierre, J.-M. Ghigo, *Mbio* **2014**, 5, e00944-13.
- [12] A. A. Popova, O. A. Koksharova, V. A. Lipasova, J. V. Zaitseva, O. A. Katkova-Zhukotskaya, S. I. Eremina, A. S. Mironov, L. S. Chernin, I. A. Khmel, *BioMed Res. Int.* **2014**, 2014, 125704.
- [13] P. Fincheira, L. Parra, A. Mutis, M. Parada, A. Quiroz, *Microbiol. Res.* **2017**, 203, 47.
- [14] D. Blom, C. Fabbri, E. C. Connor, F. P. Schiestl, D. R. Klauser, T. Boller, L. Eberl, L. Weisskopf, *Environ. Microbiol.* **2011**, 13, 3047.
- [15] P. Garbeva, C. Hordijk, S. Gerards, W. de Boer, *Front. Microbiol.* **2014**, 5.
- [16] I.-A. Ratiu, T. Ligor, V. Bocos-Bintintan, B. Buszewski, *Bioanalysis* **2017**, 9, 1069.
- [17] S. Schulz, P. Biwer, T. Harig, D. Koteska, C. Schlawis in *Comprehensive Natural Products III*, Elsevier, **2020**, S. 161–178.

- [18] C. Bicchi, C. Cordero, E. Liberto, B. Sgorbini, P. Rubiolo, *J. Chromatogr. A* **2008**, *1184*, 220.
- [19] Evangelia N. Tzanetou, Konstantinos M. Kasiotis, *World J. Anal. Chem.* **2013**, *1*, 14.
- [20] S. Manzini, C. Durante, C. Baschieri, M. Cocchi, S. Sighinolfi, S. Totaro, A. Marchetti, *Talanta* **2011**, *85*, 863.
- [21] P. Garbeva, C. Hordijk, S. Gerards, W. de Boer, *FEMS Microbiol. Ecol.* **2014**, *87*, 639.
- [22] a) K. Grob, *J. Chromatogr. A* **1973**, *84*, 255; b) P. Schreier, *Analysis of volatiles. Methods and applications ; proceedings, international workshop, Würzburg, Federal Republic of Germany, September 28-30, 1983*, W. de Gruyter, Berlin, New York, **1984**.
- [23] a) A. M. Haefner, K. L. Norton, P. R. Griffiths, S. Bourne, R. Curbelo, *Anal. Chem.* **1988**, *60*, 2441; b) S. Bourne, A. M. Haefner, K. L. Norton, P. R. Griffiths, *Anal. Chem.* **1990**, *62*, 2448.
- [24] P. Hušek, *J. Chromatogr. A* **1991**, *552*, 289.
- [25] D. M. Vidal, C. F. Fávaro, M. M. Guimarães, P. H. G. Zarbin, *J Braz Chem Soc* **2016**.
- [26] P. Linstrom, *NIST Chemistry WebBook, NIST Standard Reference Database 69*, National Institute of Standards and Technology, **1997**.
- [27] A. W. Boots, A. Smolinska, Van Berkel, J. J. B. N., Fijten, R. R. R., E. E. Stobberingh, Boumans, M. L. L., E. J. Moonen, Wouters, E. F. M., J. W. Dallinga, Van Schooten, F. J., *J. Breath Res.* **2014**, *8*.
- [28] E. Kováts, *HCA* **1958**, *41*, 1915.
- [29] a) C. F. Fávaro, P. H. G. Zarbin, *J. Chem. Ecol.* **2013**, *39*, 1182; b) H. Herrera, W. Barros-Parada, M. F. Flores, W. Francke, E. Fuentes-Contreras, M. Rodriguez, F. Santis, P. H. G. Zarbin, J. Bergmann, *J. Chem. Ecol.* **2016**, *42*, 908.
- [30] P. R. Jensen, B. S. Moore, W. Fenical, *Nat. Prod. Rep.* **2015**, *32*, 738.
- [31] a) T. K. Kim, M. J. Garson, J. A. Fuerst, *Environ. Microbiol.* **2005**, *7*, 509; b) M. E. Vidgen, J. N. A. Hooper, J. A. Fuerst, *Antonie van Leeuwenhoek* **2012**, *101*, 603.
- [32] P. R. Jensen, E. Gontang, C. Mafnas, T. J. Mincer, W. Fenical, *Environ. Microbiol.* **2005**, *7*, 1039.

- [33] H. He, W. D. Ding, V. S. Bernan, A. D. Richardson, C. M. Ireland, M. Greenstein, G. A. Ellestad, G. T. Carter, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 5362.
- [34] L. A. Maldonado, W. Fenical, P. R. Jensen, C. A. Kauffman, T. J. Mincer, A. C. Ward, A. T. Bull, M. Goodfellow, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2005**, *55*, 1759.
- [35] L. Ahmed, P. R. Jensen, K. C. Freel, R. Brown, A. L. Jones, B.-Y. Kim, M. Goodfellow, *Antonie van Leeuwenhoek* **2013**, *103*, 1069.
- [36] N. Millán-Aguíñaga, K. L. Chavarria, J. A. Ugalde, A.-C. Letzel, G. W. Rouse, P. R. Jensen, *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 3564.
- [37] B. Román-Ponce, N. Millán-Aguíñaga, D. Guillen-Matus, A. B. Chase, J. G. M. Ginigini, K. Soapi, K. D. Feussner, P. R. Jensen, M. E. Trujillo, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2020**.
- [38] a) R. H. Feling, G. O. Buchanan, T. J. Mincer, C. A. Kauffman, P. R. Jensen, W. Fenical, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 355; b) T. A. M. Gulder, B. S. Moore, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 9346.
- [39] C. J. Schulze, G. Navarro, D. Ebert, J. DeRisi, R. G. Linington, *J. Org. Chem.* **2015**, *80*, 1312.
- [40] U. Groenhagen, A. L. L. de Oliveira, E. Fielding, B. S. Moore, S. Schulz, *Chembiochem* **2016**, *17*, 1978.
- [41] Ulrike Groenhagen, *Dissertation*, TU Braunschweig, Braunschweig, **2015**.
- [42] C. Schlawis, S. Kern, Y. Kudo, J. Grunenberg, B. S. Moore, S. Schulz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, *57*, 14921.
- [43] C. Schlawis, T. Harig, S. Ehlers, D. G. Guillen-Matus, K. E. Creamer, P. R. Jensen, S. Schulz, *Chembiochem* **2020**, *21*, 1629.
- [44] T. Harig, C. Schlawis, L. Ziesche, M. Pohlner, B. Engelen, S. Schulz, *J. Nat. Prod.* **2017**, *80*, 3289.
- [45] M. Baltas, J. D. Bastide, A. de Blic, L. Cazaux, L. Gorrichon-Guigon, P. Maroni, M. Perry, P. Tisnes, *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* **1985**, *41*, 789.
- [46] R. Cano, D. J. Ramón, M. Yus, *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 5547.
- [47] J.-H. Youn, R. Herrmann, *Tetrahedron Lett.* **1986**, *27*, 1493.
- [48] N. Taniguchi, *Eur. J. Org. Chem.* **2016**, *2016*, 2157.
- [49] K. Lukas, T. Harig, S. Schulz, J. Hadersdorfer, S. Dötterl, *Chemoecology* **2019**, *29*, 211.
- [50] C. A. Citron, P. Rabe, J. S. Dickschat, *J. Nat. Prod.* **2012**, *75*, 1765.

- [51] J. H. Gross, *Massenspektrometrie*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, **2013**.
- [52] G. Socrates, *Infrared and Raman characteristic group frequencies. Tables and charts*, 3. Aufl., Wiley, Chichester, **2010**.
- [53] W. Wei, D. Cheng, J. Liu, Y. Li, Y. Ma, Y. Li, S. Yu, X. Zhang, Z. Li, *Org. Biomol. Chem.* **2016**, 14, 8356.
- [54] G. Vassilikogiannakis, N. Chronakis, M. Orfanopoulos, *J. Am. Chem. Soc* **1998**, 120, 9911.
- [55] W.C. Still, C. Gennari, *Tetrahedron Lett.* **1983**, 24, 4405.
- [56] K. Stritzke, S. Schulz, R. Nishida, *Eur. J. Org. Chem.* **2002**, 2002, 3884.
- [57] S. Xia, Y. Ma, W. Zhang, Y. Yang, S. Wu, M. Zhu, L. Deng, B. Li, Z. Liu, C. Qi, *PLoS ONE* **2012**, 7, e37487.
- [58] J. Kuzma, M. Nemecek-Marshall, W. H. Pollock, R. Fall, *Curr. Microbiol.* **1995**, 30, 97.
- [59] C. D. Geron, R. R. Arnts, *Atmospheric Environ.* **2010**, 44, 4240.
- [60] R. He, Y. Su, R.-C. Ma, S. Zhuang, *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2018**, 25, 16816.
- [61] F. Khorasheh, M. R. Gray, M. L. Selucky, *J. Chromatogr. A* **1989**, 481, 1.
- [62] M. Shimoda, H. Shigematsu, H. Shiratsuchi, Y. Osajima, *J. Agric. Food Chem.* **1995**, 43, 1616.
- [63] I. M. d. V. Moreira, L. d. F. Vilela, C. Santos, N. Lima, R. F. Schwan, *Food Res. Int.* **2018**, 109, 196.
- [64] J. S. Dickschat, S. C. Wenzel, H. B. Bode, R. Müller, S. Schulz, *Chembiochem* **2004**, 5, 778.
- [65] A. Scott-Thomas, M. Syhre, M. Epton, D. R. Murdoch, S. T. Chambers, *Tuberculosis (Edinb)* **2013**, 93, 312.
- [66] K. Wilkins, *Chemosphere* **1996**, 32, 1427.
- [67] J. S. Dickschat, E. Helmke, S. Schulz, *Chem. Biodivers.* **2005**, 2, 318.
- [68] J. S. Dickschat, H. B. Bode, T. Mahmud, R. Müller, S. Schulz, *J. Org. Chem.* **2005**, 70, 5174.
- [69] M. Müller, B. Kusebauch, G. Liang, C. M. Beaudry, D. Trauner, C. Hertweck, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, 45, 7835.
- [70] C.-Z. Wang, Y. Su, D. Li, B. Cai, Y.-L. Guo, *Anal. Lett.* **2010**, 43, 2297.
- [71] D. W. Udary, L. Zeigler, R. N. Asolkar, V. Singan, A. Lapidus, W. Fenical, P. R. Jensen, B. S. Moore, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2007**, 104, 10376.

- [72] T. Kim, T.-K. Kim, K.-D. Zoh, *J. Environ. Manage.* **2019**, 239, 8.
- [73] J. S. Dickschat, S. Wickel, C. J. Bolten, T. Nawrath, S. Schulz, C. Wittmann, *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, 2010, 2687.
- [74] E. Dellacassa, P. Moyna, *Flavour Fragr. J.* **1992**, 7, 105.
- [75] A. Wajs, R. Bonikowski, D. Kalembe, *Nat Prod Commun* **2009**, 4, 1934578X0900401.
- [76] S. Legrand, G. Nordlander, H. Nordenhem, A.-K. Borg-Karlson, C. R. Unelius, *Z Naturforsch B* **2004**, 59, 829.
- [77] B. Yu, C. Ma, W. Zhou, Y. Wang, X. Cai, F. Tao, Q. Zhang, M. Tong, J. Qu, P. Xu, *FEMS Microbiol. Lett.* **2006**, 258, 284.
- [78] T. K. S. Richter, C. C. Hughes, B. S. Moore, *Environ. Microbiol.* **2015**, 17, 2158.
- [79] H. Elgaali, T. R. Hamilton-Kemp, M. C. Newman, R. W. Collins, K. Yu, D. D. Archbold, *J. Basic Microbiol.* **2002**, 42, 373.
- [80] S. Horinouchi, T. Beppu, *Mol. Microbiol.* **1994**, 12, 859.
- [81] H. Onaka, T. Nakagawa, S. Horinouchi, *Mol. Microbiol.* **1998**, 28, 743.
- [82] W. Francke, G. Hindorf, W. Reith, *Angew. Chem.* **1978**, 90, 915.
- [83] W. Francke, V. Heemann, B. Gerken, J. A. A. Renwick, J. P. Vit, *Naturwissenschaften* **1977**, 64, 590.
- [84] M. Del Carmen Alcudia-León, R. Lucena, S. Cárdenas, M. Valcárcel, *J. Chromatogr. A* **2016**, 1455, 57.
- [85] "BacDive. The Bacterial Diversity Metadatabase", zu finden unter <https://bacdive.dsmz.de/strain/23122>.
- [86] a) J. S. Dickschat, H. B. Bode, S. C. Wenzel, R. Müller, S. Schulz, *Chembiochem* **2005**, 6, 2023; b) J. S. Dickschat, I. Wagner-Döbler, S. Schulz, *J. Chem. Ecol.* **2005**, 31, 925.
- [87] A. J. Dickinson, K. Lehner, J. Mi, K.-P. Jia, M. Mijar, J. Dinneny, S. Al-Babili, P. N. Benfey, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **2019**, 116, 10563.
- [88] a) D. C. Robacker, A. J. Martinez, J. A. Garcia, R. J. Bartelt, *Florida Entomol.* **1998**, 81, 497; b) A. B. DeMilo, C.-J. Lee, D. S. Moreno, A. J. Martinez, *J. Agric. Food Chem.* **1996**, 44, 607.
- [89] J. S. Dickschat, H. Reichenbach, I. Wagner-Döbler, S. Schulz, *Eur. J. Org. Chem.* **2005**, 4141.

- [90] a) G. Purcaro, P. Q. Tranchida, L. Barp, S. Moret, L. S. Conte, L. Mondello, *Anal. Chim. Acta* **2013**, 773, 97; b) J. C. Ge, H. Y. Kim, S. K. Yoon, N. J. Choi, *Fuel* **2018**, 218, 266.
- [91] M. S. Yamaguchi, H. H. Ganz, A. W. Cho, T. H. Zaw, G. Jospin, M. M. McCartney, C. E. Davis, J. A. Eisen, D. A. Coil, *PLoS ONE* **2019**, 14, e0216846.
- [92] C. A. Citron, J. Gleitzmann, G. Laurenzano, R. Pukall, J. S. Dickschat, *Chembiochem* **2012**, 13, 202.
- [93] S. Lafhal, I. Bombarda, N. Dupuy, M. Jean, K. Ruiz, P. Vanloot, N. Vanthuyne, *J. Chromatogr. A* **2020**, 1610, 460568.
- [94] C. Höckelmann, F. Jüttner, *Flavour Fragr. J.* **2005**, 20, 387.
- [95] Y. Zhang, J. Du, X. Ding, F. Zhang, *Environ Earth Sci* **2016**, 75, 1.
- [96] G. W. Gribble, *Environ. Sci. Technol.* **1994**, 28, 310A-9A.
- [97] a) W. Zhang, Y. Gao, Y. Qin, M. Wang, J. Wu, G. Li, T. An, *Environ. Pollut.* **2019**, 247, 362; b) A. J. Murray, J. P. Riley, *Nature* **1973**, 242, 37.
- [98] J. S. Dickschat, T. Martens, T. Brinkhoff, M. Simon, S. Schulz, *Chem. Biodivers.* **2005**, 2, 837.
- [99] J. S. Dickschat, S. Wickel, C. J. Bolten, T. Nawrath, S. Schulz, C. Wittmann, *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, 2010, 2687.
- [100] M. Thelestam, M. Curvall, C. R. Enzell, *Toxicology* **1980**, 15, 203.
- [101] a) L. Ren, Y. Jia, N. Ruth, C. Qiao, J. Wang, B. Zhao, Y. Yan, *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2016**, 23, 16609; b) F. Zhu, C. Zhu, E. Doyle, H. Liu, D. Zhou, J. Gao, *Sci. Total Environ.* **2018**, 637-638, 460.
- [102] A.-S. Claeson, J.-O. Levin, G. Blomquist, A.-L. Sunesson, *J Environ Monit* **2002**, 4, 667.
- [103] a) L. Wang, Y. Li, J. Duan, *J. Environ. Sci. Health A Tox. Hazard. Subst. Environ. Eng.* **2014**, 49, 27; b) E. J. O'Loughlin, S. R. Kehrmeier, G. K. Sims, *Int. Biodeterior. Biodegradation* **1996**, 38, 107.
- [104] V. Thiel, T. Brinkhoff, J. S. Dickschat, S. Wickel, J. Grunenberg, I. Wagner-Döbler, M. Simon, S. Schulz, *Org. Biomol. Chem.* **2010**, 8, 234.
- [105] M. Ortega-Heras, M.L. González-SanJosé, S. Beltrán, *Anal. Chim. Acta* **2002**, 458, 85.
- [106] C. Lapadatescu, C. Giniès, J. L. Le Quéré, P. Bonnarne, *Appl. Environ. Microbiol.* **2000**, 66, 1517.

- [107]a) C. Vallverdú, R. Vila, D. Lorenzo, D. Paz, E. Dellacassa, P. Davies, J. Villamil, F. Tomi, J. Casanova, S. Cañigüeral, *Flavour Fragr. J.* **2005**, *20*, 421;
b) B. Kivcak, T. Mert, H. Saglam, T. Ozturk, M. Kurkcuoglu, K. H. C. Baser, *Chem Nat Compd* **2007**, *43*, 47.
- [108] U. Groenhagen, R. Baumgartner, A. Bailly, A. Gardiner, L. Eberl, S. Schulz, L. Weisskopf, *J. Chem. Ecol.* **2013**, *39*, 892.
- [109] A.-D. Gong, H.-P. Li, L. Shen, J.-B. Zhang, A.-B. Wu, W.-J. He, Q.-S. Yuan, J.-D. He, Y.-C. Liao, *Front. Microbiol.* **2015**, *6*, 1091.
- [110] C. A. Rees, A. Shen, J. E. Hill, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2016**, *1039*, 8.
- [111] N. L. Brock, B. Tudzynski, J. S. Dickschat, *Chembiochem* **2011**, *12*, 2667.
- [112] T. Rahn, F. Bendrath, M. Hein, W. Baumann, H. Jiao, A. Börner, A. Villinger, P. Langer, *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 5172.
- [113] H. Stetter, L. Simons, *Chem. Ber.* **1985**, *118*, 3172.
- [114] L. Skattebøl, Y. Stenstrøm, C. E. Olsen, H. Toftlund, I. Søtofte, F. Mo, T. Bartfai, Ü. Langel, *Acta Chem. Scand.* **1995**, *49*, 543.
- [115] Z.-Q. Zhang, X.-Y. Meng, J. Sheng, Q. Lan, X.-S. Wang, *Org. Lett.* **2019**, *21*, 8256.
- [116]a) E. Amavizca, Y. Bashan, C.-M. Ryu, M. A. Farag, B. M. Bebout, L. E. De-Bashan, *Sci. Rep.* **2017**, *7*; b) J. Julák, E. Procházková-Francisci, E. Stránská, V. Rosová, *J. Microbiol. Methods* **2003**, *52*, 115.
- [117]a) T. R. Mellors, C. A. Rees, W. F. Wieland-Alter, C. F. von Reyn, J. E. Hill, *J. Breath Res.* **2017**, *11*; b) E. Kasbohm, S. Fischer, A. Küntzel, P. Oertel, A. Bergmann, P. Trefz, W. Miekisch, J. K. Schubert, P. Reinhold, M. Ziller et al., *J. Breath Res.* **2017**, *11*.
- [118] N. Patel, N. Alkhouri, K. Eng, F. Cikach, L. Mahajan, C. Yan, D. Grove, E. S. Rome, R. Lopez, R. A. Dweik, *Aliment. Pharmacol. Ther.* **2014**, *40*, 498.
- [119] L. D. J. Bos, P. J. Sterk, M. J. Schultz, *PLoS Pathog.* **2013**, *9*.
- [120] "AMDIS - Automated Mass spectral Deconvolution and Identification System", zu finden unter
<https://chemdata.nist.gov/dokuwiki/doku.php?id=chemdata:amdis>.
- [121] K. Hiller, J. Hangebrauk, C. Jäger, J. Spura, K. Schreiber, D. Schomburg, *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 3429.

- [122] R Core Team (2020), *R. A language and environment for statistical computing*, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, **2020**.
- [123] G. H. Dunteman, *Principal components analysis*, Sage Publ, Newbury Park, Calif., **2006**.
- [124] H. F. Kaiser, K. W. Dickmann, *Am Psychol* **1959**, 425.
- [125] K. Backhaus, B. Erichson, W. Plinke, R. Weiber, *Multivariate Analysemethoden. Eine anwendungsorientierte Einführung*, 559. Aufl., Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, **2006**.
- [126] T. Jombart, S. Devillard, F. Balloux, *BMC Genet.* **2010**, 11, 94.
- [127] a) M. A. Babyak, *Psychosom Med* **2004**, 66, 411; b) M. Fokkema, S. Greiff, *Eur J Psychol Assess* **2017**, 33, 399; c) T. Yarkoni, J. Westfall, *Perspect Psychol Sci* **2017**, 12, 1100.
- [128] T. Jombart, *Bioinformatics* **2008**, 24, 1403.
- [129] C. C. Thibaut Jombart, "A tutorial for Discriminant Analysis of Principal Components (DAPC) using adegenet 2.1.0", zu finden unter <https://github.com/thibautjombart/adegenet/raw/master/tutorials/tutorial-dapc.pdf>, **2017**.
- [130] H. D. Bean, J. Zhu, J. E. Hill, *J. Visualized Exp* **2011**, 1.
- [131] N. V. Patin, D. J. Floros, C. C. Hughes, P. C. Dorrestein, P. R. Jensen, *Microbiology* **2018**, 164, 946.
- [132] "Metabolite Detector Documentation", zu finden unter https://metabolitedetector.tu-bs.de/wiki/index.php/Documentation#Agilent_6890_GC_.2F_5975B_MS, **2010**.
- [133] "MASS. Support Functions and Datasets for Venables and Ripley's MASS", zu finden unter <https://www.rdocumentation.org/packages/MASS/versions/7.3-53>.
- [134] A. A. G. Fernandes, I. A. Leonarczyk, M. A. B. Ferreira, L. C. Dias, *Org. Biomol. Chem.* **2019**, 17, 3167.
- [135] L. Wang, Z. Xu, T. Ye, *Org. Lett.* **2011**, 13, 2506.
- [136] J. D. More, N. S. Finney, *Org. Lett.* **2002**, 4, 3001.
- [137] D. Hayashi, N. Tsukioka, Y. Inoue, Y. Matsubayashi, T. Iizuka, K. Higuchi, Y. Ikegami, T. Kawasaki, *Bioorg Med Chem* **2015**, 23, 2010.
- [138] A. R. O. Venning, M. R. Kwiatkowski, J. E. Roque Peña, B. C. Lainhart, A. A. Guruparan, E. J. Alexanian, *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, 139, 11595.

- [139] D. Saha, R. Ghosh, R. Dutta, A. K. Mandal, A. Sarkar, *J Organomet Chem* **2015**, 776, 89.
- [140] J. S. Tan, M. A. Ciufolini, *Org. Lett.* **2006**, 8, 4771.
- [141] M. Kawasaki, H. Yamamoto, *J. Am. Chem. Soc* **2006**, 128, 16482.

6.2. Abkürzungsverzeichnis

Ac	Acetyl
AHLs	<i>N</i> -Acylhomoserinlactone
bipy	2,2'-Bipyridin
Bu	Butyl
CLSA	Cloes-Loop-Stripping-Analysis
DAPC	Diskriminantenanalyse der Hauptkomponenten (<i>discriminant analysis of principal components</i>)
DFT	Dichtefunktionaltheorie (<i>density-functional theory</i>)
DHS	dynamische Gasphasenanalyse (<i>dynamic Headspace</i>)
DIPA	Diisopropylamin
DIPEA	<i>N,N</i> -Diisopropylethylamin
DMDS	Dimethyldisulfid
DME	1,2-Dimethoxyethan
DMSO	Dimethylsulfoxid
EI	Elektronenstoßionisation (<i>electron impact ionization</i>)
Et	Ethyl
GBL	γ -Butyrolacton
GC	Gaschromatographie
GC/DD-FTIR	Gaschromatographie mit gekoppelter Infrarotspektroskopie
GC/MS	Gaschromatographie mit gekoppelter Massenspektrometrie
HRMS	hochaufgelöste Massenspektrometrie
HWE	Horner-Wadsworth-Emmons-Reaktion
<i>i</i> Bu	Isobutyl
IBX	2-Iodoxybenzoesäure
<i>i</i> Pentyl	Isopentyl
<i>i</i> Pr	Isopropyl
IR	Infrarot
LD	lineare Diskriminante
LDA	lineare Diskriminanzanalyse (<i>linear discriminant analysis</i>)
LDA	Lithiumdiisopropylamin
<i>m/z</i>	Masse/Ladungs-Verhältnis
MD	Metabolite Detector
Me	Methyl
OSSA	Open-System-Stripping-Analysis
PC	Hauptkomponente (<i>principal component</i>)

PCA	Hauptkomponentenanalyse (<i>principal component analysis</i>)
PLP	Pyridoxalphosphat
PLP	Pyridoxalphosphat
Pr	Propyl
RDA	Retro-Diels-Alder
RI	Retentionsindex
RMSE	Wurzel der mittleren Fehlerquadratsumme (<i>root mean squared error</i>)
RT	Raumtemperatur
SAM	S-Adenosylmethionin
SHS	statische Gasphasenanalyse (<i>static Headspace</i>)
SPME	Festphasen-Mikroextraktion (<i>Solid-Phase-Microextraction</i>)
TDU	Thermische Desorptionseinheit
THF	Tetrahydrofuran
TIC	Totalionenstromchromatogramm
TMS	Trimethylsilan
Ts	Tosyl-
VOCs	volatile organische Verbindungen

6.3. Abbildungen

Abbildung 1: Übersicht über verschiedene bakterielle VOCs: Dimethyldisulfid (3), Trimethylamin (2), 2,3-Butandiol (6), Acetoin (7), 2-Nonanon (4), 2-Undecanon (5) und Geosmin (1).....	2
Abbildung 2: links: Schematischer Aufbau einer OSSA-Apparatur, rechts: Schematischer Aufbau einer CLSA-Apparatur.	4
Abbildung 3: Fundorte der drei Salinispora-Spezies <i>S. tropica</i> , <i>S. arenicola</i> und <i>S. pacifica</i> . ^[30]	5
Abbildung 4: Strukturen von Salinisporamid A (8) und Salinipostin A (9) aus <i>Salinispora</i>	6
Abbildung 5: Massenspektrum des von GROENHAGEN identifizierten (<i>Z</i>)-Methyl 2-(cyclohex-2-enyliden)acetats	7
Abbildung 6: Massenspektrum von Salinilacton A (16) mit Fragmentierung.	8
Abbildung 7: Strukturen der bereits von GROENHAGEN und SCHLAWIS identifizierten flüchtigen Cyclohexenyl-Verbindungen (10-15) und Salinilactone A-H (16-23) aus <i>Salinispora</i> -Bakterien. ^[40,43]	8
Abbildung 8: IR-Spektrum der unbekannten Verbindung A	12
Abbildung 9: Massenspektren der Sulfinamide 24 (oben) und 25 (unten) mit Fragmentierung.....	13
Abbildung 10: Massenspektren der natürlich vorkommenden (links) und synthetischen Imine 28-30 (rechts). Sowohl 29 also auch 30 kommen nur in sehr geringen Konzentrationen vor und werden durch anderen Verbindungen überlagert, sodass keine sauberen Massenspektren erhalten wurden.	15
Abbildung 11: Chromatogramme der chiralen GC (β -Dex 255 Kapillarsäule) zur Bestimmung der absoluten Konfiguration von 31	16
Abbildung 12: Übersicht über die bereits bekannten (26 , 31-38) und neuen Imine (28-30) aus <i>S. pacifica</i> CNS-863.	17
Abbildung 13: Massenspektren des natürlich vorkommenden (links) und synthetischen Formamids 39 (rechts).	18
Abbildung 14: IR-Spektrum der unbekannten Verbindung B	18
Abbildung 15: Massenspektren des (E)-Methylesters 41 (links) und des natürlich vorkommenden (<i>Z</i>)-2,5-Dimethyl-2,4-hexensäuremethylesters (43) (rechts) aus <i>S. oceanensis</i> CNT-403.	19

Abbildung 16: Totalionenstromchromatogramme der OSSA (A) und CLSA (B) aus <i>S. arenicola</i> CNS-205.	21
Abbildung 17: IR-Spektrum der unbekannten Verbindung C	23
Abbildung 18: Massenspektrum der unbekannten Verbindung C (links), des Syntheseprodukts 58 (rechts), sowie Strukturvorschlag mit Fragmentierung.	23
Abbildung 19: Massenspektren der natürlich vorkommenden (links) und synthetischen (rechts) Oxime 62 und 63 , sowie deren Fragmentierungsmuster.	25
Abbildung 20: Strukturen flüchtiger Substanzen aus <i>S. arenicola</i> CNS-205.	27
Abbildung 21: Totalionenstromchromatogramme der OSSA (A) und CLSA (B) aus <i>S. tropica</i> CNB-440.	28
Abbildung 22: Strukturen neuer flüchtiger Substanzen aus <i>S. tropica</i> CNB-440.	30
Abbildung 23: Totalionenstromchromatogramme der OSSA (A) und CLSA (B) aus <i>S. arenicola</i> CNH-643.	32
Abbildung 24: Massenspektren der unbekannten Verbindungen E – G	33
Abbildung 25: Strukturen flüchtiger Substanzen aus <i>S. arenicola</i> CNH-643.	34
Abbildung 26: Totalionenstromchromatogramme der OSSA (A) und CLSA (B) aus <i>S. pacifica</i> CNR-114.	36
Abbildung 27: Strukturen flüchtiger Substanzen aus <i>S. pacifica</i> CNR-114.	38
Abbildung 28: Massenspektren der unbekannten Verbindungen H und I	38
Abbildung 29: Totalionenstromchromatogramme der OSSA (A) und CLSA (B) aus <i>S. pacifica</i> CNR-894.	41
Abbildung 30: Strukturen flüchtiger Substanzen aus <i>S. pacifica</i> CNR-894.	42
Abbildung 31: Massenspektren der unbekannten Verbindungen J - M , sowie die durch Datenbankabgleich gemachten Strukturvorschläge 152 und 153	43
Abbildung 32: Totalionenstromchromatogramme der OSSA (A) und CLSA (B) aus <i>S. fenicalii</i> CNR-942.	45
Abbildung 33: Massenspektrum eines der gefundenen Diterpene in <i>S. fenicalii</i> CNR-942.	46
Abbildung 34: Strukturen flüchtiger Substanzen aus <i>S. fenicalii</i> CNR-942.	47
Abbildung 35: Totalionenstromchromatogramme der OSSA (A) und CLSA (B) aus <i>S. cortesiana</i> CNY-202.	49
Abbildung 36: Strukturen flüchtiger Substanzen aus <i>S. cortesiana</i> CNY-202.	51

Abbildung 37: Massenspektren der unbekannten Verbindungen N - R aus <i>S. cortesiana</i> CNY-202, sowie der Strukturvorschlag 169 und Vergleichspektrum des Imins 26	52
Abbildung 38: Totalionenstromchromatogramme der OSSA (A) und CLSA (B) aus <i>S. vitiensis</i> CNS-055.....	55
Abbildung 39: Strukturen flüchtiger Substanzen aus <i>S. vitiensis</i> CNS-055.....	56
Abbildung 40: Totalionenstromchromatogramme der OSSA (A) und CLSA (B) aus <i>S. mooreana</i> CNS-237.....	59
Abbildung 41: Strukturen flüchtiger Substanzen aus <i>S. mooreana</i> CNS-237.....	60
Abbildung 42: Massenspektren der unbekannten Verbindungen S-W aus <i>S. mooreana</i> CNS-237.....	61
Abbildung 43: Totalionenstromchromatogramme der OSSA (A) und CLSA (B) aus <i>S. oceanensis</i> CNT-029.....	63
Abbildung 44: Strukturen flüchtiger Substanzen aus <i>S. oceanensis</i> CNT-029.....	64
Abbildung 45: Massenspektrum der unbekannten Verbindung X	65
Abbildung 46: Totalionenstromchromatogramme der OSSA (A) und CLSA (B) aus <i>S. oceanensis</i> CNT-403.....	68
Abbildung 47: Massenspektren der natürlich vorkommenden Verbindung Z (links) und des synthetischen Ketons 204 (rechts).....	69
Abbildung 48: Strukturen flüchtiger Substanzen aus <i>S. oceanensis</i> CNT-403.....	71
Abbildung 49: Massenspektren der unbekannten Verbindungen AA-AF aus CNT-403.....	71
Abbildung 50: Massenspektren der unbekannten Verbindungen AG-AL aus CNT-403.....	72
Abbildung 51: Massenspektren der natürlich vorkommenden Verbindung AM und der synthetisch hergestellten Verbindungen 213-215	74
Abbildung 52: Massen- und IR-Spektrum der unbekannten Verbindungen Y und vier mögliche Strukturvorschläge.....	75
Abbildung 53: Totalionenstromchromatogramme der OSSA (A) und CLSA (B) aus <i>S. oceanensis</i> CNT-854.....	79
Abbildung 54: Strukturen flüchtiger Substanzen aus <i>S. oceanensis</i> CNT-854.....	81
Abbildung 55: Totalionenstromchromatogramme der OSSA (A) und CLSA (B) aus <i>S. goodfellowii</i> CNY-666.....	83

Abbildung 56: Vergleich der Massenspektren von 2-Hydroxy-3-methoxybenzoesäuremethylester (231) (links) und der unbekannten Verbindung Q (rechts).....	84
Abbildung 57: Strukturen flüchtiger Substanzen aus <i>S. goodfellowii</i> CNY-666.	84
Abbildung 58: DAPC (37 PCs) mit Trennung basierend auf den untersuchten Stämmen (o. links), den einzelnen Spezies (o. rechts) und den ursprünglichen Spezies (unten). Die Achsen zeigen jeweils die Varianz der ersten zwei linearen Diskriminanten.	89
Abbildung 59: Zuordnungswahrscheinlichkeit der zwei Modelle aus der Trennung nach den Stämme (oben) und den Spezies (unten) aus der DAPC.	91
Abbildung 60: Zuordnungswahrscheinlichkeit der zwei Modelle aus der Trennung nach den Stämmen (oben) und den Spezies (unten) aus der OSSA-DAPC.....	94
Abbildung 61: Ergebnisse der OSSA-DAPC mit Trennung nach den Stämmen (oben) und Spezies (unten). Dargestellt sind jeweils die Trennung entlang LD1 & LD2 sowie LD1 & LD3 die ersten zwei linearen Diskriminanten.....	95
Abbildung 62: Schematischer Aufbau der CLSA-Apparatur zur Extraktion der flüchtigen Verbindungen in Kommunikationsexperimenten.....	98
Abbildung 63: Beispiele einiger Agar-Platten von Einzel- und Dualkulturen zur Beobachtung des Einflusses volatiler Verbindungen auf des Wachstumsverhalten..	99
Abbildung 64: GC/MS Chromatogramme der Einzelmessungen von <i>S. arenicola</i> CNS-205 und <i>B. algicola</i> CUA-796 sowie der Dualkultur. Sowohl das Oxim 58 , der Alkohol 107 und auch die beiden Salinilactone 16 und 17 wurden in deutlich geringeren Mengen gemessen. Ein Anstieg hingegen war bei den beiden Verbindungen Benzoesäuremethylester (168) und Geranylaceton (165) zu beobachten.....	102
Abbildung 65: Strukturen der neuen Oxime aus <i>Salinispora</i> -Bakterien.	106
Abbildung 66: Aromatische Methylester aus <i>S. cortesiana</i> CNY-202, <i>S. goodfellowii</i> CNY-666 und <i>S. tropica</i> CNB-440.	106
Abbildung 67: Neue bakterielle Naturstoffe aus <i>S. oceanensis</i> CNT-403.	107
Abbildung 68: Neue Verbindungen aus <i>S. pacifica</i> CNS-863.....	107

6.4. Schemata

Schema 1: Synthese der Sulfinamide 24 und 25	12
Schema 2: Synthese der unbekannten Imine 28-30 und des (S)-Konformers von (E)-N-(2-Methylbutyl)-1-phenylmethanimin (31).....	14
Schema 3: Möglicher Imin-Biosyntheseweg aus den Aminosäuren.	16
Schema 4: Synthese des Formamids 39	17
Schema 5: Synthese der Methylester 41 und 43 aus <i>S. oceanensis</i> CNT-403.	19
Schema 6: Synthese der unverzweigten Oxime 58-60	23
Schema 7: Synthese der methylverzweigten Oxime 62 und 63	25
Schema 8: Synthese (E)-4,6-Dimethyloct-6-en-3-on (204) als unbekannte Verbindung Z	69
Schema 9: Synthese des Ketons 206 als möglicher Strukturvorschlag für die unbekannte Verbindung AM	73
Schema 10: Reaktionsübersicht zur Synthese von 213-215 zur Bestimmung der unbekannten Verbindung AM	74

6.5. Tabellen

Tabelle 1: Auswahl der analysierten <i>Salinispora</i> -Bakterien und ihre Zuordnung zu den einzelnen Spezies. Typenstämme sind durch ein (T) gekennzeichnet. ^[37]	10
Tabelle 2: Flüchtige Verbindungen aus den Gasphasenextrakten von <i>S. arenicola</i> CNH-643. Die Intensitäten der einzelnen Verbindungen werden mit 0-1% (o), 1-10% (x), 10-30% (xx), 30-100% (xxx) relativ zur Gesamtpeakfläche des Totalionenstromchromatogramms angegeben.	34
Tabelle 3: Flüchtige Verbindungen aus den Gasphasenextrakten von <i>S. pacifica</i> CNR-114. Die Intensitäten der einzelnen Verbindungen werden mit 0-1% (o), 1-10% (x), 10-30% (xx), 30-100% (xxx) relativ zur Gesamtpeakfläche des Totalionenstromchromatogramms angegeben.	38
Tabelle 4: Flüchtige Verbindungen aus den Gasphasenextrakten von <i>S. fenicalii</i> CNR-942. Die Intensitäten der einzelnen Verbindungen werden mit 0-1% (o), 1-10% (x), 10-30% (xx), 30-100% (xxx) relativ zur Gesamtpeakfläche des Totalionenstromchromatogramms angegeben.	43
Tabelle 5: Flüchtige Verbindungen aus den Gasphasenextrakten von <i>S. fenicalii</i> CNR-942. Die Intensitäten der einzelnen Verbindungen werden mit 0-1% (o), 1-10% (x), 10-30% (xx), 30-100% (xxx) relativ zur Gesamtpeakfläche des Totalionenstromchromatogramms angegeben.	47
Tabelle 6: Flüchtige Verbindungen aus den Gasphasenextrakten von <i>S. cortesiana</i> CNY-202. Die Intensitäten der einzelnen Verbindungen werden mit 0-1% (o), 1-10% (x), 10-30% (xx), 30-100% (xxx) relativ zur Gesamtpeakfläche des Totalionenstromchromatogramms angegeben.	52
Tabelle 7: Flüchtige Verbindungen aus den Gasphasenextrakten von <i>S. vitiensis</i> CNS-055. Die Intensitäten der einzelnen Verbindungen werden mit 0-1% (o), 1-10% (x), 10-30% (xx), 30-100% (xxx) relativ zur Gesamtpeakfläche des Totalionenstromchromatogramms angegeben.	56
Tabelle 8: Flüchtige Verbindungen aus den Gasphasenextrakten von <i>S. mooreana</i> CNS-237. Die Intensitäten der einzelnen Verbindungen werden mit 0-1% (o), 1-10% (x), 10-30% (xx), 30-100% (xxx) relativ zur Gesamtpeakfläche des Totalionenstromchromatogramms angegeben.	61
Tabelle 9: Flüchtige Verbindungen aus den Gasphasenextrakten von <i>S. oceanensis</i> CNT-029. Die Intensitäten der einzelnen Verbindungen werden mit 0-1% (o), 1-10%	

(x), 10-30% (xx), 30-100% (xxx) relativ zur Gesamtpeakfläche des Totalionenstromchromatogramms angegeben.	65
Tabelle 10: Flüchtige Verbindungen aus den Gasphasenextrakten von <i>S. oceanensis</i> CNT-403. Die Intensitäten der einzelnen Verbindungen werden mit 0-1% (o), 1-10% (x), 10-30% (xx), 30-100% (xxx) relativ zur Gesamtpeakfläche des Totalionenstromchromatogramms angegeben.	76
Tabelle 11: Flüchtige Verbindungen aus den Gasphasenextrakten von <i>S. oceanensis</i> CNT-854. Die Intensitäten der einzelnen Verbindungen werden mit 0-1% (o), 1-10% (x), 10-30% (xx), 30-100% (xxx) relativ zur Gesamtpeakfläche des Totalionenstromchromatogramms angegeben.	80
Tabelle 12: Flüchtige Verbindungen aus den Gasphasenextrakten von <i>S. goodfellowii</i> CNY-666. Die Intensitäten der einzelnen Verbindungen werden mit 0-1% (o), 1-10% (x), 10-30% (xx), 30-100% (xxx) relativ zur Gesamtpeakfläche des Totalionenstromchromatogramms angegeben.	85
Tabelle 13: Übersicht über die a-scores für die DAPC mit 37 PCs.	89
Tabelle 14: Ergebnisse Kreuzvalidierung zur Optimierung der Anzahl an verwendeten PCs in der DAPC.	90
Tabelle 15: Übersicht über die a-scores der DAPCs mit optimierter Anzahl von PCs.	90
Tabelle 16: Ergebnisse Kreuzvalidierung zur Optimierung der Anzahl an verwendeten PCs in der OSSA-DAPC.	93
Tabelle 17: Übersicht über die a-scores der DAPCs aus der OSSA mit optimierter Anzahl von PCs.	93
Tabelle 18: VOCs mit einem Anteil an den Linearen Diskriminanten $\geq 2.00\%$	97
Tabelle 19: Verwendete Bakterienstämme für die Kommunikationsexperimente mit <i>Salinispora</i> -Bakterien.	100
Tabelle 20: Ergebnisse der Wachstumsexperimente von den 11 Bakterienstämmen (links) mit den Referenzstämmen CNB-440 und CNS-205 (rechts). o keine Änderung, - geringeres Wachstum, + erhöhtes Wachstum.	101
Tabelle 21: Veränderungen in den Konzentrationen ausgewählter Metabolite während der Kommunikationsexperimente mit <i>S. arenicola</i> CNS-205. (x): vom Stamm produziert, (+): erhöhte Konzentration, (-): verringerte Konzentration, (0) keine Produktion.	104

Tabelle 22: Veränderungen in den Konzentrationen ausgewählter Metabolite während der Kommunikationsexperimente mit <i>S. tropica</i> CNB-440. (x): vom Stamm produziert, (+): erhöhte Konzentration, (-): verringerte Konzentration, (0) keine Produktion.....	105
Tabelle 23: Flüchtige Verbindungen aus den Gasphasenextrakten von <i>S. arenicola</i> CNS-205. Die Intensitäten der einzelnen Verbindungen werden mit 0-1% (o), 1-10% (x), 10-30% (xx), 30-100% (xxx) relativ zur Gesamtpeakfläche des Totalionenstromchromatogramms angegeben.	154
Tabelle 24: Flüchtige Verbindungen aus den Gasphasenextrakten von <i>S. tropica</i> CNB-440. Die Intensitäten der einzelnen Verbindungen werden mit 0-1% (o), 1-10% (x), 10-30% (xx), 30-100% (xxx) relativ zur Gesamtpeakfläche des Totalionenstromchromatogramms angegeben.	155

7. Anhang

Tabelle 23: Flüchtige Verbindungen aus den Gasphasenextrakten von *S. arenicola* CNS-205. Die Intensitäten der einzelnen Verbindungen werden mit 0-1% (o), 1-10% (x), 10-30% (xx), 30-100% (xxx) relativ zur Gesamtpeakfläche des Totalionenstromchromatogramms angegeben.

Verbindung	RI _{exp} ^a	RI _{lit} ^b	Ident. ^c	OSSA 1 (THG191)	OSSA 2 (THG192)	OSSA 3 (THG193)	CLSA (THG115)
Isopren (45)	511	498	ms, ri	x	-	x	-
2,3-Butandion (48)	587	595	ms, ri	o	o	o	-
2,3-Pentandion (49)	694	698	ms, ri	o	-	o	-
1-Hydroxy-2-propanon (47)	710	665	ms	-	o	o	-
3-Methyl-3-buten-1-ol (51)	724	730	ms, ri	x	x	x	-
Acetoin (7)	735	713	ms	o	o	x	-
(E)-2-Methylbut-2-en-1-ol (52)	774	769	ms, ri	o	o	o	o
3-Methyl-2-butenal (46)	776	782	ms, ri	o	o	o	-
Prenol (50)	790	775	ms, ri	-	-	-	o
Essigsäurebutylester (85)	810	812	ms, ri	o	o	o	-
2-Hydroxy-3-pentanone (96)	815	821	ms, ri	-	-	o	o
Butansäure-S-methylthioester (53)	842		ms	o	o	o	-
4-Hydroxy-4-methyl-2-pentanone (131)	846	838	ms, ri	o	o	o	o
3-Methylbutansäure (115)	847	863	ms, ri	o	o	o	o
Ethylbenzol	855	855	ms, ri	o	o	o	-
p-Xylol	864	865	ms, ri	o	x	o	-
1-Hexanol (81)	866	868	ms, ri	o	o	o	-
o-Xylol (133)	889	887	ms, ri	o	o	o	-
2,5-Dimethylpyrazin (144)	910	917	ms, ri	x	x	x	xx
4-Methyl-2-pentensäuremethylester (86)	929		ms	o	o	o	-
α-Pinen (76)	931	937	ms, ri	o	o	o	-
3-Methylbutansäure-S-methylthioester (54)	937	938	ms, ri	o	-	o	-
4-Methyl-3-pentensäuremethylester (87)	940		ms	-	o	o	-
2-Methylbutanolid (56)	949	948	ms, ri	o	o	o	-
3-Methylbutanolid (57)	956		ms	x	-	x	-
(E)-3-(Hydroxyimino)butan-2-on (59)	958	961	ms, std	x	x	x	-
6-Methyl-2-heptanol (82)	964		ms	-	o	o	-
Dimethyltrisulfid (149)	965	970	ms, ri	-	-	-	x
1,3,5-Trimethylbenzol (79)	965	972	ms, ri	o	o	o	-
1-Heptanol (91)	971	970	ms, ri	o	o	-	o
2-Furansäuremethylester (164)	975	980	ms, ri	o	o	o	-
2-Methyl-2-butenolid	979		ms	o	o	o	-
4-Methyl-3-pentensäure (83)	984	1011	ms	o	-	o	o
Verbindung F	1017			o	o	o	-
unbekannt 114, 97, 83, 70, 57	1029			-	-	-	o
Benzylalkohol (117)	1033	1036	ms, ri	o	o	x	x
unbekannt 116, 97, 69, 56, 41	1037			o	o	o	-
unbekannt 114, 96, 69, 60, 55	1043			o	o	o	o
(E)-2-(Hydroxyimino)pentan-3-on (58)	1053	1051	ms, std	x	x	xx	x
2-Acetylpyrrol (74)	1060	1064	ms, ri	o	o	o	o
verzweigtes Alkan RI = 1064	1064			o	-	o	-
3-Ethyl-2,5-dimethylpyrazin (138)	1083	1082	ms, ri	o	o	o	o
Benzoesäuremethylester (168)	1092	1094	ms, ri	x	x	x	o
(E)-2-(Hydroxyimino)-4-methylpentan-3-on (62)	1095	1095	ms, std	o	o	o	-
Phenylethylalkohol (107)	1110	1116	ms, ri	x	x	x	xx
Nicotinsäuremethylester (27)	1135	1139	ms, ri	-	-	-	x
(E)-2-(Hydroxyimino)hexan-3-on (60)	1139	1142	ms, std	o	o	o	-
γ-Heptalacton (126)	1150	1159	ms, ri	o	o	o	o
Tropon (191)	1152	1182	ms	o	-	o	-
2-Phenyl-1-propanol (80)	1170	1179	ms, ri	o	o	o	-
Menthol (77)	1170	1174	ms, ri	-	o	-	o
Phenyllessigsäuremethylester (88)	1176	1178	ms, ri	o	o	o	-
Naphthalin	1178	1182	ms, ri	o	o	o	-
unbekannt 135, 87, 42	1184			-	-	-	o

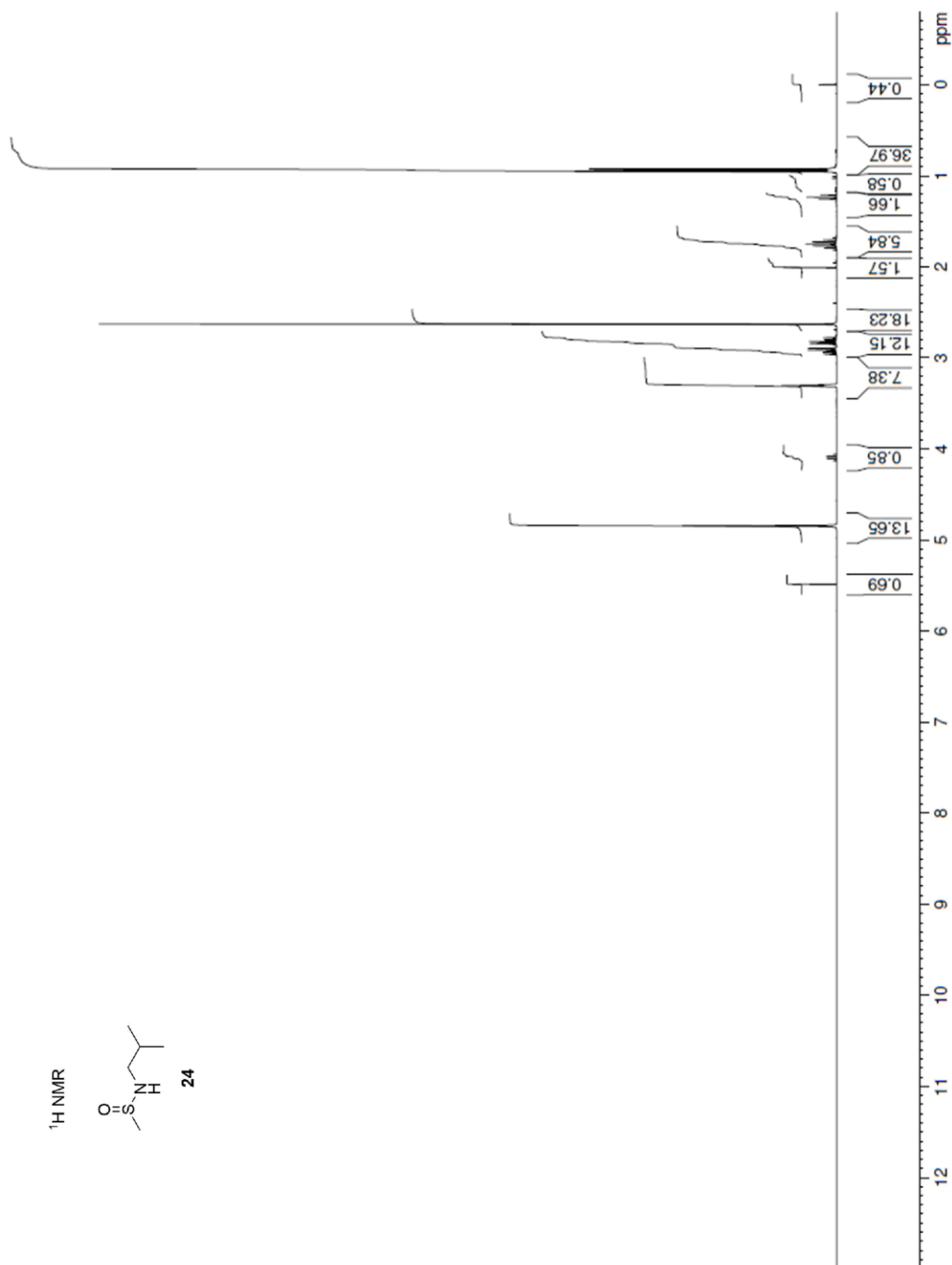
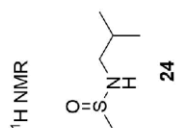
(E)-2-(Hydroxyimino)-5-methylhexan-3-on (63)	1189	1190	ms, std	o	o	o	-
Salicylsäuremethylester (147)	1191	1192	ms, ri	o	o	o	o
Cyclohexylisothiocyanat (55)	1228	1234	ms, std	o	o	o	-
Phenyllessigsäureethylester (89)	1243	1246	ms, ri	o	-	o	-
Geraniol (118)	1253	1255	ms, ri	-	-	-	o
γ -Butylbutyrolacton	1255	1261	ms, ri	-	-	-	o
Nonansäure (84)	1267	1273	ms, ri	-	-	-	o
δ -Octalacton (129)	1281	1288	ms, ri	-	-	-	o
2-Acetylanilin (75)	1297	1308	ms, ri	o	-	o	o
Methylsalicylsäuremethylester	1312			o	o	o	-
Geraniumsäuremethylester (137)	1323	1324	ms, ri	o	o	o	o
unbekannt 154, 111, 99, 84, 71, 55, 43	1333			o	-	o	-
Salinilacton F (21)	1368	1368	ms, std	o	o	o	o
unbekannt 183, 167, 149, 127, 85, 71, 57	1403			o	o	o	-
Salinilacton A (16)	1410	1410	ms, std	o	o	o	o
Geranylacetone (165)	1452			o	o	o	o
Salinilacton B (17)	1467	1468	ms, std	-	o	o	o
unbekannt Methylester	1474			-	-	-	o
unbekannt 218, 203, 189, 175, 161	1478			o	o	o	-
unbekannt 168, 140, 125	1480			-	o	o	-
Verbindung G	1483			-	-	-	o
unbekannt 166, 153, 123, 111, 83	1516			o	o	o	-
Dihydroactinidiol (78)	1525	1538	ms, ri	-	-	-	o
Salinilacton C (18)	1528	1527	ms, std	o	o	o	o
unbekannt 167, 111, 69, 57	1558			o	-	o	-
Diäthylether (150)	1662	1659	ms, ri	-	-	-	o
Diterpen 272, 229, 136	1706			o	o	o	-
Diterpen 272, 229, 189	1729			o	-	o	-
Diterpen 272, 229, 173, 159, 145	1832			o	-	o	-
unbekannt 242, 132, 119, 95	1848			o	o	o	-
2-Heptadecanon	1897			-	-	-	o
Isopimara-8,15-dien	1912		ms	o	o	o	o
Hexadecansäureisobutylester	2023	2023	ms, ri	-	-	-	o

Tabelle 24: Flüchtige Verbindungen aus den Gasphasenextrakten von *S. tropica* CNB-440. Die Intensitäten der einzelnen Verbindungen werden mit 0-1% (o), 1-10% (x), 10-30% (xx), 30-100% (xxx) relativ zur Gesamtpeakfläche des Totalionenstromchromatogramms angegeben.

Verbindung	RI _{exp} ^a	RI _{lit} ^b	Ident. ^c	OSSA 1 (THG203)	OSSA 2 (THG204)	OSSA 3 (THG205)	CLSA (THG108)
Isopren (45)	520	498	ms, ri	x	-	x	-
2,3-Butandion (48)	603	595	ms, ri	o	-	o	-
1-Butanol (90)	669	659	ms, ri	x	x	x	-
1-Hydroxy-2-propanon (47)	714	665	ms	o	o	o	-
3-Methyl-3-buten-1-ol (51)	727	730	ms, ri	x	x	x	-
Acetoin (7)	737	713	ms	o	o	o	-
2-Methylpropansäure (113)	769	774	ms, ri	x	x	x	-
3-Methyl-2-butenal (46)	778	782	ms, ri	o	o	o	-
Prenol (50)	781	755	ms, ri	x	-	-	o
Cyclopentanone (154)	787	791	ms, ri	o	o	o	o
Essigsäurebutylester (85)	811	812	ms, ri	o	-	o	-
2-Hydroxy-3-pentanone (96)	815	821	ms, ri	o	-	o	x
3-Methyl-2-butenensäuremethylester (97)	838	842	ms, ri	o	o	x	-
Butansäure-S-methylthioester (53)	842		ms	o	-	o	-
4-Hydroxy-4-methyl-2-pentanone	847	838	ms, ri	-	-	-	o
1-Hexanol (81)	867	868	ms, ri	o	-	o	-
3-Heptanon	884	887	ms, ri	o	o	-	-
2-Hydroxy-3-hexanon (94)	898	896	ms, ri	-	-	-	o
1-Hexanthiol (105)	918	922	ms, ri	-	o	o	-
4-Methyl-2-pentensäuremethylester (86)	931		ms	o	o	o	-
4-Methyl-3-pentensäuremethylester (87)	941		ms	o	o	o	-

2-Hydroxy-5-methylhexan-3-on (95)	945	945	ms, std	-	-	o	o
(E)-3-(Hydroxyimino)butan-2-on (59)	958	961	ms, std	-	-	-	o
1-Heptanol (91)	972	970	ms, ri	-	-	o	o
2-Furansäuremethylester (164)	976	980	ms, ri	x	x	x	o
4-Methyl-3-pentensäure (83)	984	1011	ms	o	o	o	o
Cyclohept-4-enon (136)	1004		ms	o	o	o	-
2-Cyclohexene-1-methanol (12)	1010	1011	ms, ri	o	o	o	x
unbekannt 114, 97, 83, 70, 57	1030			-	-	-	o
(E)-2-(Hydroxyimino)pentan-3-on (58)	1052	1051	ms, std	o	o	o	o
2-Cyclohexen-1-carbonsäuremethylester (10)	1075	1073	ms, ri	-	o	o	o
Verbindung H	1088			o	o	o	-
Benzoessäuremethylester (168)	1093	1094	ms, ri	-	xx	xxx	x
3-Methyl-2-furansäuremethylester (101)	1094		ms	o	-	o	-
2-Thiophencarbonsäuremethylester (103)	1100		ms	o	o	o	o
2,6-Dimethylcyclohexanol (92)	1105	1112	ms, ri	-	-	-	o
3-Thiophencarbonsäuremethylester (104)	1108		ms	o	o	o	o
Phenylethylalkohol (107)	1110	1116	ms, ri	x	x	x	x
2-Cyclohexene-1-ethanol (13)	1124	1120	ms, ri	-	o	o	o
Nicotinylalkohol (93)	1134		ms	-	-	-	o
(E)-2-(Hydroxyimino)hexan-3-on (60)	1139	1142	ms, std	o	-	o	o
Methyl 2-(cyclohex-2-enyl)acetat (11)	1164	1160	ms, ri	-	-	-	x
Benzoessäure (174)	1171	1170	ms, ri	-	x	o	-
Menthol (77)	1171	1174	ms, ri	o	-	o	-
Phenyllessigsäuremethylester (88)	1176	1178	ms, ri	o	o	o	o
unbekannt 126, 101, 85, 57, 41	1188			-	-	-	o
Salicylsäuremethylester (147)	1191	1192	ms, ri	o	o	o	o
2-Cumaranon (160)	1229		ms	o	o	o	-
δ-Lacton RI = 1244	1246			-	o	o	-
(E)-Methyl 2-(cyclohex-2-enyliden)acetat (15)	1254	1253	ms, ri	x	x	x	x
(Z)-Methyl 2-(cyclohex-2-enyliden)acetat (14)	1275	1274	ms, ri	o	x	x	o
5-(Methoxymethyl)furan-2-carbonsäuremethylester (106)	1286	1280	ms, ri	-	-	-	o
Anthranilsäuremethylester (40)	1340	1343	ms, ri	-	-	-	xxx
p-Methoxybenzoessäuremethylester (99)	1373			o	o	o	-
Zimtsäuremethylester (98)	1381	1379	ms, ri	o	o	o	o
Salinilacton A (16)	1410	1410	ms, std	-	-	-	o
2-Hydroxy-5-methoxybenzoessäuremethylester (102)	1439	1448	ms, ri	-	o	o	-
Salinilacton B (17)	1468	1468	ms, std	-	-	-	o
2-Amino-3-methoxybenzoessäuremethylester (100)	1547		ms	-	-	-	o

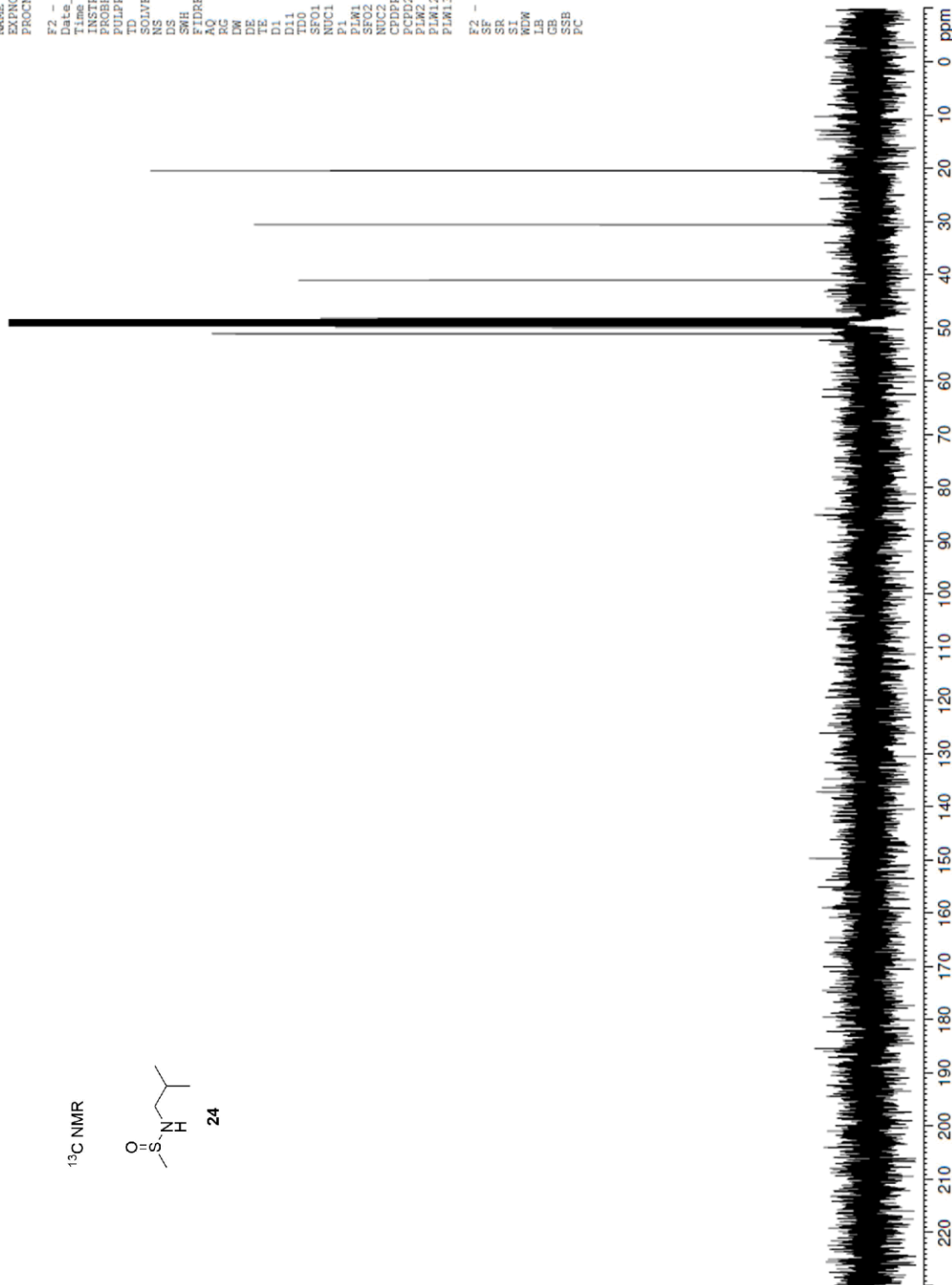
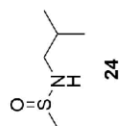
Current Data Parameters
 NAME hat-170515-162940_oz
 EXPNO 1
 PROCNO 1
 F2 - Acquisition Parameters
 Date_ 20170515
 Time 17.30 h
 INSTRUM AVIHD300N
 PROBD Z104275_0359 (49152
 PULPROG zg30
 TD 49152
 SOLVENT MeOD
 NS 24
 DS 2
 SWH 6203.474 Hz
 FIDRES 0.252420 Hz
 AQ 3.9616511 sec
 RG 203.32
 DW 80.600 usec
 DE 6.50 usec
 IE 286.0 K
 D1 1.00000000 sec
 D11 1.00000000 sec
 SFO1 300.2618538 MHz
 NUC1 ¹H
 P1 12.00 usec
 PL1 10.8509983 W
 F2 - Processing parameters
 SF 300.2600074 MHz
 SR 7.35 Hz
 SI 32768
 MDW 0 Hz
 LB 0
 GB 0
 SSB 0
 PC 1.00



Current Data Parameters
NAME hat-170515-162940_oz
EXPNO 2
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20170515
Time 17:43 h
INSTRUM AVIHD00N
PROBHD Z104275_03500N
PULPROG zgpg30
TD 32768
SOLVENT MeOD
NS 136
DS 4
SWH 19736.842 Hz
FIDRES 0.401547 Hz
AQ 2.4903679 sec
RG 13.04
DW 25.333 usec
DE 6.50 usec
TE 298.0 K
D1 2.00000000 sec
D11 0.03000000 sec
TD0 1
SFO1 75.508171 MHz
NUC1 13C
P1 9.50 usec
PLW1 51.05799866 W
SFO2 300.2612010 MHz
NUC2 1H
PCPRG2 waltz16
PLW2 10.85099983 W
PLW12 0.19228980 W
PLW13 0.09637566 W

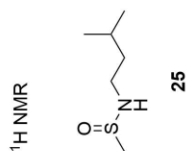
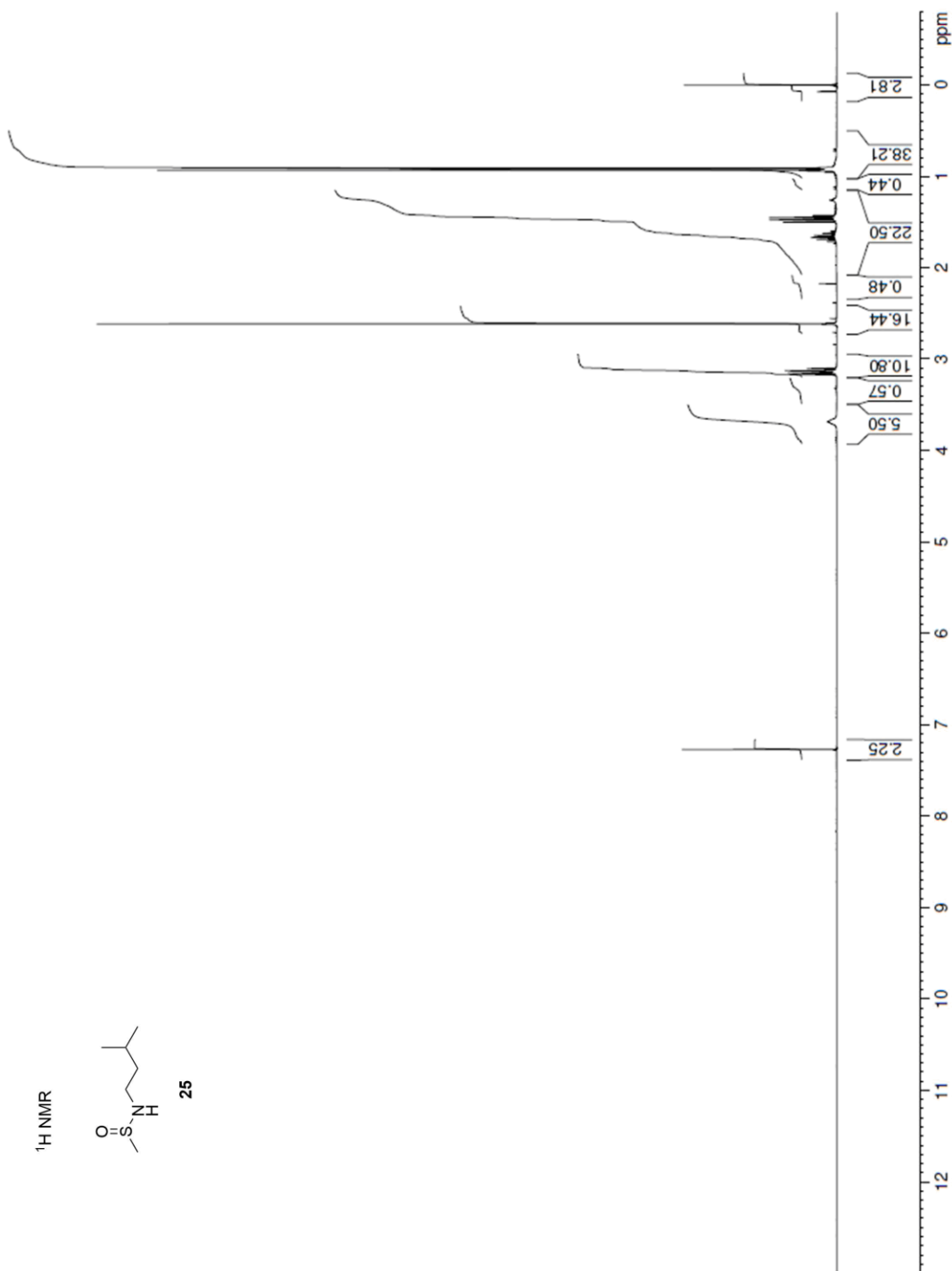
F2 - Processing Parameters
SF 75.503299 MHz
SR -108.15 Hz
SI 65536
WDW EM
LB 1.00 Hz
GB 0
SSB 0
PC 1.40

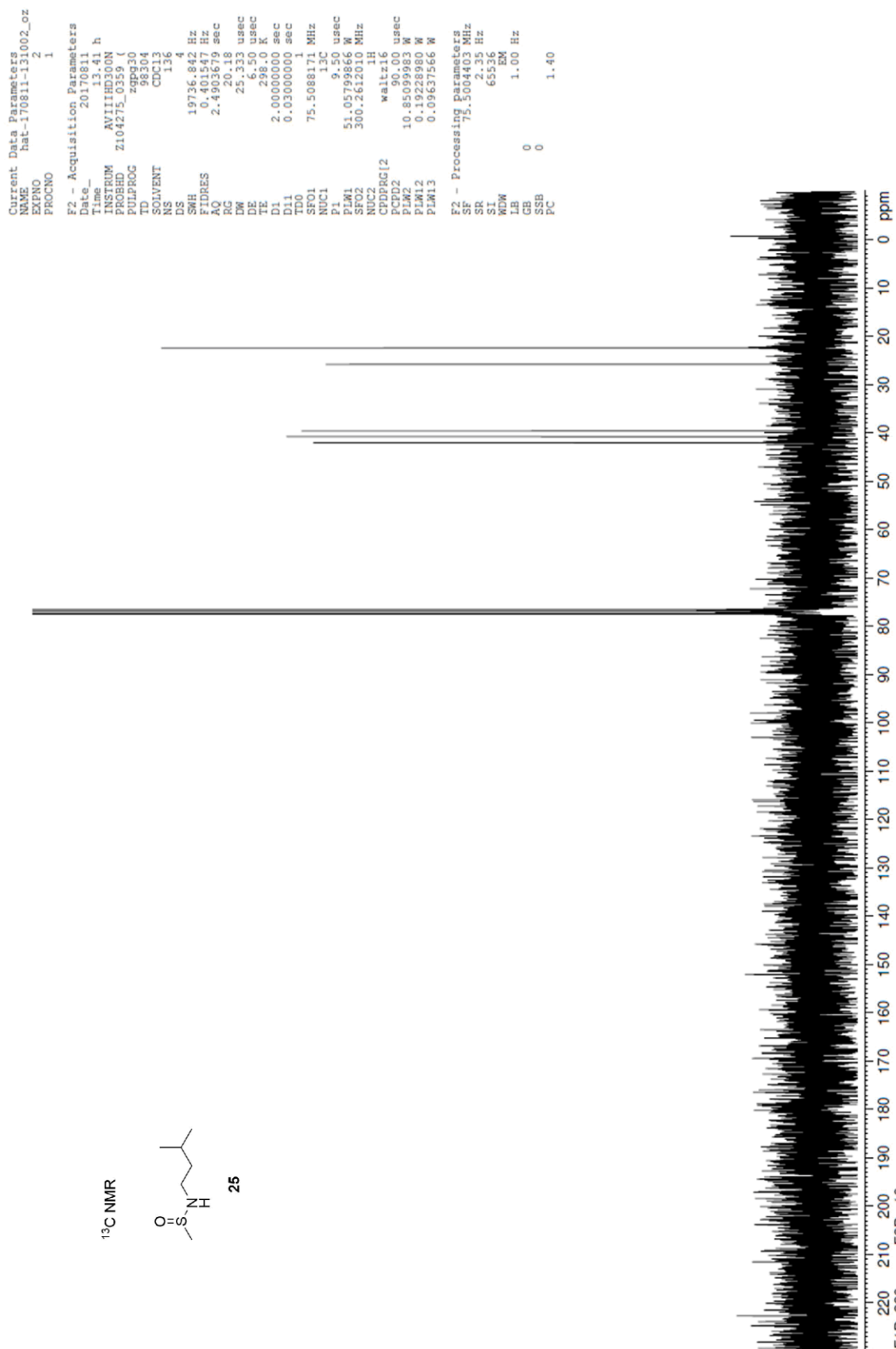
¹³C NMR

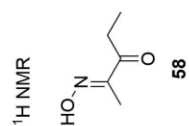
Current Data Parameters
 NAME hat-170811-131002_oz
 EXPNO 1
 PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
 Date_ 20170811
 Time 13.28 h
 INSTRUM AVIIND300N
 PULPROG zgpg30
 TD 65536
 SOLVENT CDCl3
 NS 24
 DS 2
 SWH 6203.474 Hz
 FIDRES 0.252420 Hz
 AQ 3.961611 sec
 RG 203.32
 DW 80.600 usec
 DE 6.50 usec
 TE 298.0 K
 D1 1.0000000 sec
 TD0 1
 SFO1 300.2618538 MHz
 NUC1 1H
 P1 12.00 usec
 PL1 10.8509983 W

F2 - Processing parameters
 SF 300.2600110 MHz
 SR 11.03 Hz
 SI 32768
 PC 1.00
 LB 0 Hz
 GB 0
 SSB 0
 PC 1.00



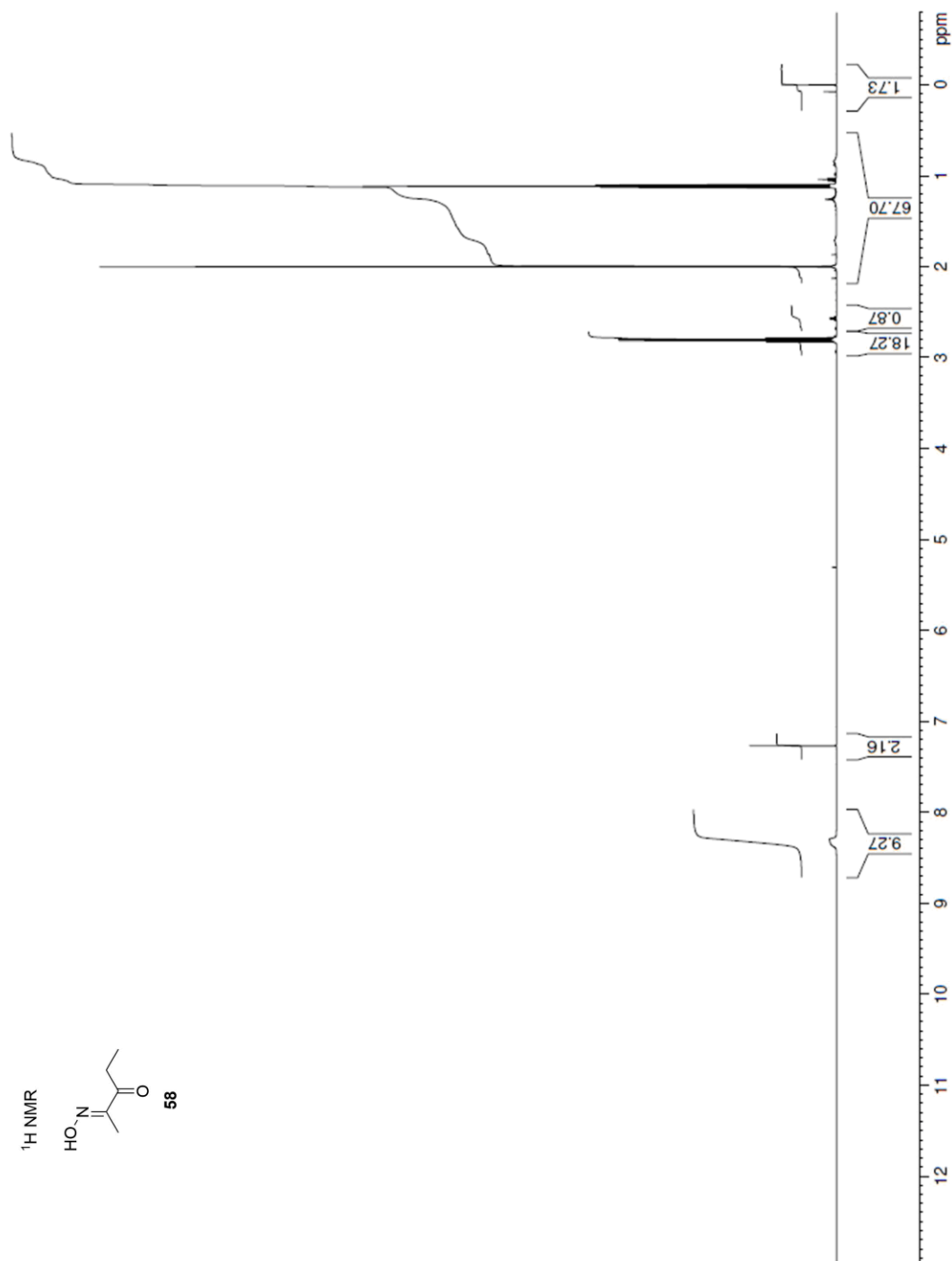




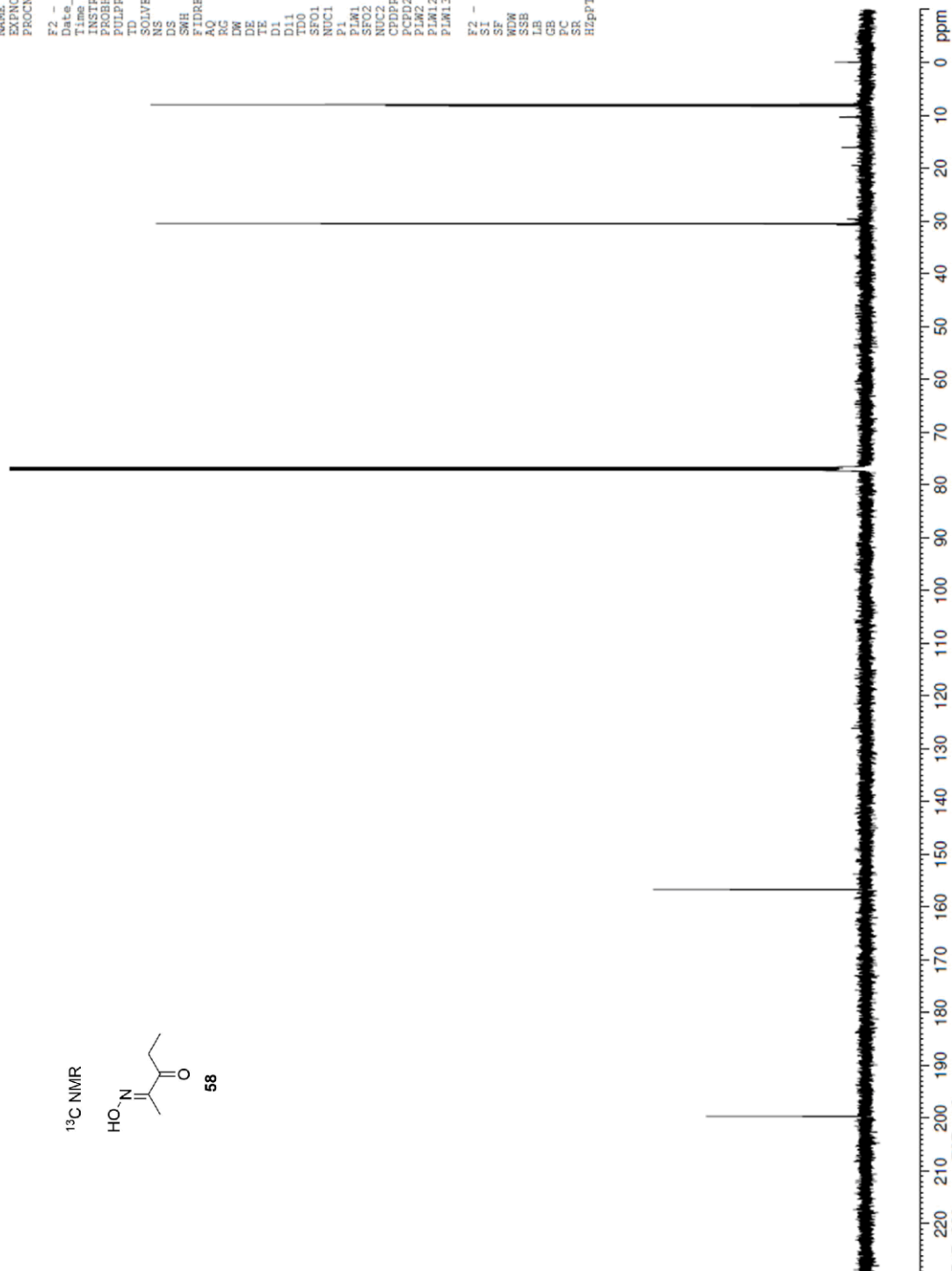
Current Data Parameters
 NAME hat134171_02
 EXPNO 1
 PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
 Date_ 20171104
 Time 6.47 h
 INSTRUM AVIIHD500
 PROBHD Z125869_0056 (z930)
 PULPROG zg30
 TD 65536
 SOLVENT CDCl3
 NS 24
 DS 2
 SWH 10000.005 Hz
 FIDRES 0.35176 Hz
 AQ 3.256199 sec
 RG 29.74
 DW 50.000 usec
 DE 10.00 usec
 TE 298.0 K
 D1 2.00000000 sec
 TD0 1
 SFO1 500.3230895 MHz
 NUC1 1H
 P1 10.00 usec
 PLW1 18.00000000 W

F2 - Processing parameters
 SI 32768
 SF 500.3200193 MHz
 WDW EM
 SSB 0
 LB 0 Hz
 GB 0
 PC 1.00
 SR 19.32 Hz
 HZPT 0.305176 Hz

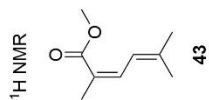
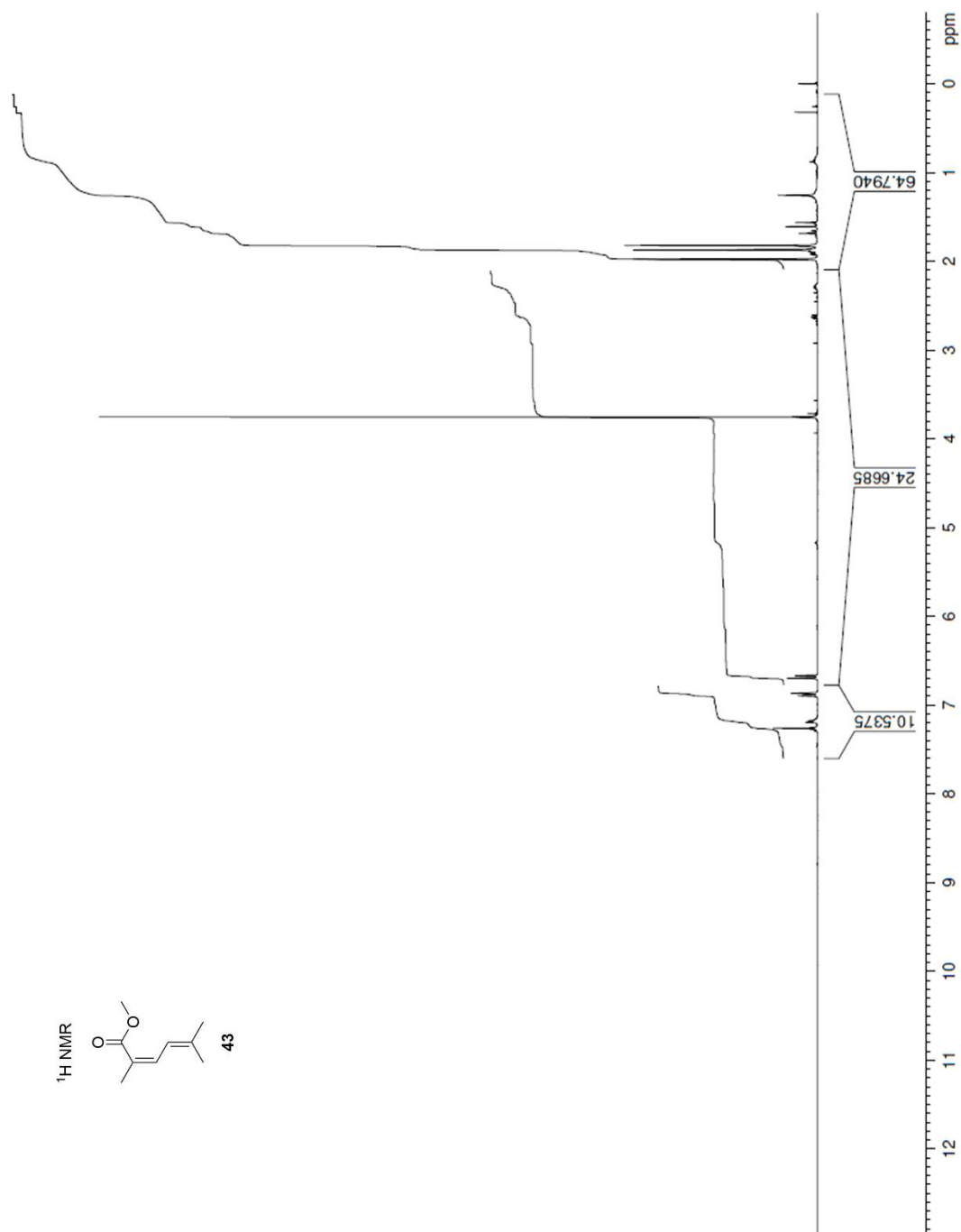


Current Data Parameters
Date_ 20171104
Time_ 6.56 h
INSTRUM AVIIHD500
PROBHD Z125869.0056 {
PULPROG zgpg30
TD 131072
SOLVENT CDC13
NS 96
DS 4
SWH 31250.000 Hz
FIDRES 0.476837 Hz
AQ 2.033122 sec
RG 16.82
RG 16.82
DE 16.000 usec
TE 288.0 K
D1 2.38000011 sec
D11 0.03000000 sec
TD0 10
SFO1 125.8196527 MHz
NUC1 13C
P1 8.50 usec
PLW1 76.73300171 W
SFO2 500.3220013 MHz
NUC2 1H
CPDPRG2 waltz16
PCPD2 18.000000 usec
PLW2 0.3497580 W
PLW3 0.17479780 W
F2 - Processing parameters
SI 65536
SF 125.8055687 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 1.00 Hz
GB 0
PC 1.40
SR 3.73 Hz
HzpT 0.476837 Hz



NAME hat138032_oz
 EXPNO 1
 PROCNO 1
 Date_ 20190220
 Time 12.13
 INSTRUM AVII400
 PROBHD 5 mm PABBO BB-
 PULPROG zgpg30
 TOU 19.22
 SOLVENT CDCl3
 NS 64
 DS 2
 SWH 8223.685 H
 FIDRES 0.125483 H
 AQ 3.9846387 s
 RG 64
 DW 60.800 u
 DE 6.50 u
 TE 296.9 K
 D1 1.00
 TDO 1.00000000 s

--- CHANNEL f1 ---
 NUC1 1H
 P1 10.20 u
 PL1 -4.00 d
 SFO1 400.4024726 M
 SI 32768
 SF 400.4000192 M
 SR 19.22 H
 EX
 WDW EM
 SS 0
 GB 0.00 H
 PC 1.40
 F1P 13.000 P
 F2P -0.800 P

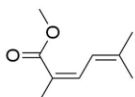


NAME hat138032_02
EXPNO 1
PROCNO 1
Date_ 20190220
Time_ 12:21
INSTRUM AVII400
PROBHD 5 mm PABBO BB-
PULPROG zgpg30
TD 131072
SOLVENT CDC13
NS 288
DS 4
SWH 26315.789 H
FIDRES 0.200774 H
AQ 2.4904180 s
RG 101
DE 19.000 u
TE 298.2 K
D1 2.00000000 s
D11 0.03000000 s
D10 10

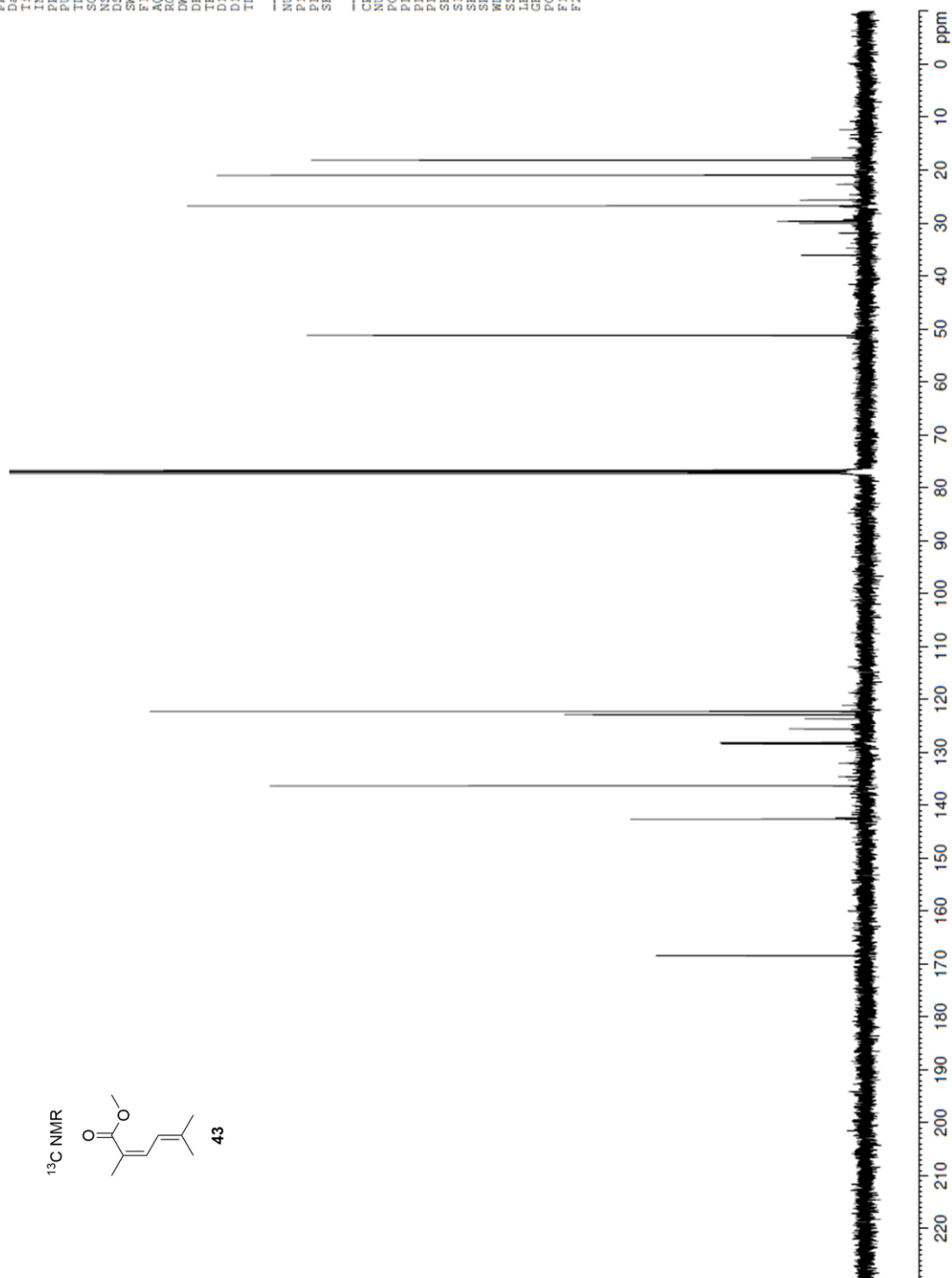
CHANNEL f1
NUC1 13C
P1 8.95 u
PL1 -3.00 d
SFO1 100.6918371 M

CHANNEL f2
CPDPRG2 waltz16
NUC2 1H
PCPD2 80.00 u
PL2 -13.90 d
PL12 13.90 d
PL13 14.00 d
SFO2 400.4016016 M
SI 65536
SF 100.6806552 M
SR 4.17 H
SSB EM
WDW 0
SSB 1.00 H
LB 0
GB 0
PC 1.40
F1P 230.000 P
F2P -10.000 P

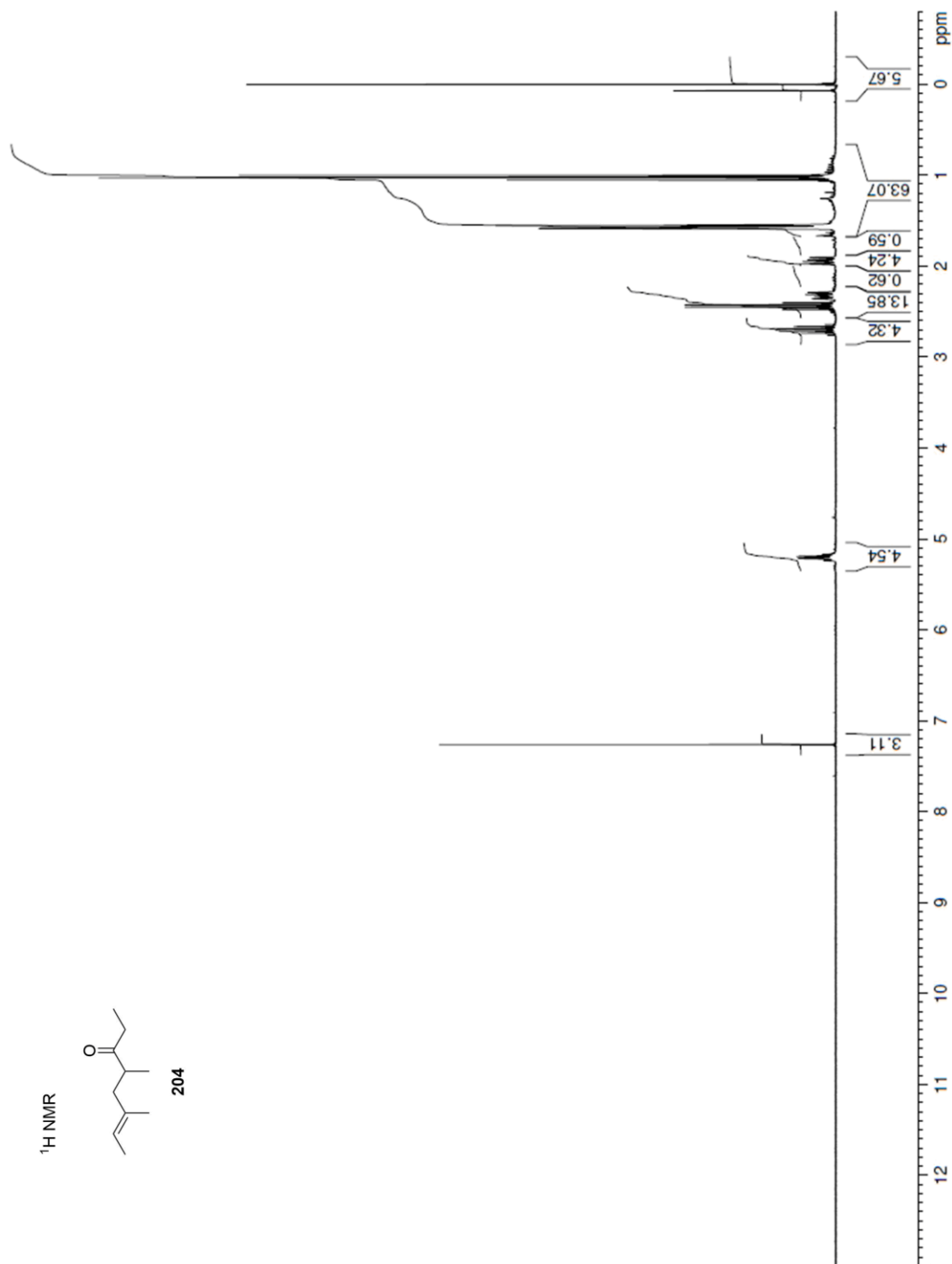
¹³C NMR



43



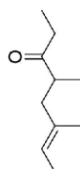
Current Data Parameters
 NAME Hat-200625-181916_oz
 EXPNO 1
 PROCNO 1
 F2 - Acquisition Parameters
 Date_ 20200626
 Time_ 3.59 h
 INSTRUM AVIHD300N
 PROBHD Z104275_0359 (49152)
 PULPROG zg30
 TD 49152
 SOLVENT CDCl3
 NS 24
 DS 2
 SWH 6203.474 Hz
 FIDRES 0.252420 Hz
 AQ 3.9616511 sec
 RG 203.32
 DW 80.600 usec
 DE 6.50 usec
 TE 298.0 K
 D1 1.00000000 sec
 D11
 D12
 SFO1 300.2618531 MHz
 NUC1 1H
 PC 4.00 usec
 PL 12.00 usec
 PLW1 10.85099983 W
 F2 - Processing parameters
 SI 32768
 SF 300.2600129 MHz
 NLW
 SSB 0
 LB 0 Hz
 GB 0
 PC 1.00



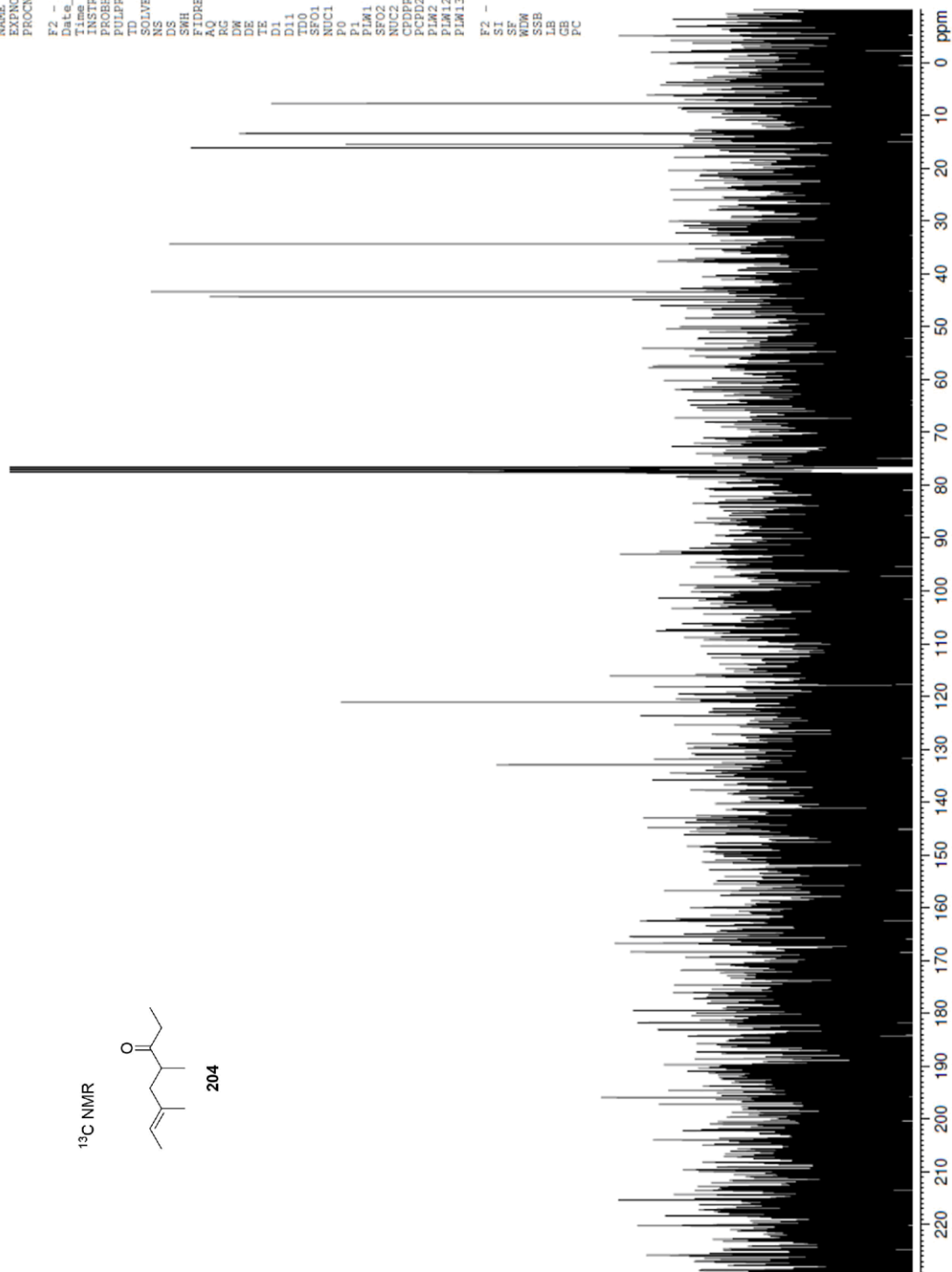
Current Data Parameters
NAME hat-200625-181916_oz
EXPNO 2
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20200626
Time 4.11 h
INSTRUM AVIHD300N
PROBHD Z104275_0359 (z9p350
PULPROG zgpg30
SOLVENT CDCl3
NS 116
DS 4
SWH 19736.842 Hz
FIDRES 0.401547 Hz
AQ 2.4903679 sec
RG 18.62
DW 25.333 usec
DE 6.50 usec
TE 298.0 K
D1 2.00000000 sec
D11 0.03000000 sec
TD0 1
SFO1 75.5088171 MHz
NUC1 13C
P0 3.17 usec
PL1 3.17 usec
PL11 51.06799626 W
SFO2 300.2612010 MHz
NUC2 1H
CPDPRG2 waltz16
PCPD2 90.00 usec
PLW2 10.85099983 W
PLW12 0.19291000 W
PLW13 0.09703100 W

F2 - Processing parameters
SI 65536
SF 75.5004394 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 1.00 Hz
GB 0
PC 1.40

¹³C NMR

204



R-Script für die Durchgeführte DAPC

```

require(ggplot2)
require(scales)
require(gridExtra)
require(ggtext)
require(ggsci)
require(brew)
require(plotly)
require(MASS)
require(adeigenet)
require(readr)
require(dplyr)

#Daten einlesen und Formatieren
workpath<-setwd("C:/ ") #Arbeitsverzeichnis einfügen
Salinispora_Rohdaten <- read_delim(paste(workpath,"/Salinispora Rohdaten.csv",sep=""),",", escape_double = FALSE, trim_ws
= TRUE)
df<-Salinispora_Rohdaten
df[1:6]<-df[1:6] %>% mutate_if(is.character,as.factor)
df[7:348]<-df[7:348] %>% mutate_if(is.double,as.numeric)
colnames(df)[colnames(df) == "Spezies-alt"] <- "Salinispora"
ossa<-df[df$Analyse == "OSSA",]
ossa2<-ossa[7:348] %>% select_if(colSums(.) != 0)
ossa<-cbind(ossa[1:6], ossa2)

#Auswahl des Faktor für die Diskriminanzanalyse
daten<-"Bakterium" #Faktor angeben
if(daten == "Bakterium"){
  d<-1
} else if(daten == "Spezies"){
  d<-2
} else if(daten == "Salinispora"){
  d<-3
} else if(daten == "Fundort"){
  d<-5
}
#DAPC OSSA Nr.1
dapc.daten<-dapc(ossa[7:257], grp = ossa[[daten]], var.contrib = T, center = T, scale = T, n.da=3, n.pca = 37) #DAPC mit hoher
Anzahl an PCs
xval <- xvalDapc(ossa[7:257], ossa[[daten]], n.pca.max = 300, training.set = 0.9,
  result = "groupMean", center = TRUE, scale = FALSE,
  n.pca = NULL, n.rep = 30, xval.plot = TRUE) #Kreuzvalidierung
k<-seq(1,50)
ascore<-c()
stemp<-c()
for (i in k){
  temp<-a.score(dapc.daten)
  mtemp<-temp$mean
  stemp<-cbind(stemp,temp$pop.score)
  ascore<-c(ascore, mtemp)
} #Berechnung des ascores als Mittelwert aus 50 Iterationen

```

```
#Ausgabe der Daten
score<-round(mean(ascore),3)
einzel_score<-apply(stemp, 1, mean)
print(score)
print(einzel_score)
print(xval[2:6])

#Auswahl der optimierten Anzahl an PCs
n_pcs <- as.numeric(readline(prompt="Wie viele PCs sollen genutzt werden?: "))
dapc.daten<-dapc(ossa[7:257], grp = ossa[[daten]], var.loadings = T, var.contrib = T, center = T, scale = T, n.da=3 ,n.pca =
n_pcs)

#Optimierte ascore Berechnung
k<-seq(1,50)
ascore<-c()
stemp<-c()
for (i in k){
  temp<-a.score(dapc.daten)
  mtemp<-temp$mean
  stemp<-cbind(stemp,temp$pop.score)
  ascore<-c(ascore, mtemp)
}
score<-round(mean(ascore),3)
einzel_score<-apply(stemp, 1, mean)

#Manuelle DAPC zum Plotten der Daten
pca.scaled<-prcomp(ossa[7:257], center = T, scale = T)
pcs<-pca.scaled$x[,1:n_pcs]
pcs<-as.data.frame(cbind(ossa[1:6],pcs))
f<-paste(names(pcs)[d], "~", paste(names(pcs)[-c(1:6)], collapse = " + "))
pca.lda<-lda(as.formula(paste(f)), data = pcs)
prop.lda<-pca.lda$svd^2/sum(pca.lda$svd^2)
lda.result<-predict(pca.lda)

my_log <- file("my_log.txt") # Dateiname der ausgegebenen Log-Datei
sink(my_log, append = TRUE, type = "output") # Writing console output to log file
print('mean a-score')
print(score)
print('a-scores of groups')
print(einzel_score)
print(xval[2:6])
closeAllConnections() # Close connection to log file

i1<-ggplot(as.data.frame(lda.result$x), aes(x=lda.result$x[,1], y=lda.result$x[,2])) +
  geom_point(aes(color=factor(ossa[[daten]])),size=5, alpha=0.7) +
  labs(x= paste("LD1 (", percent(prop.lda[1]), "%)", sep=""),
       y= paste("LD2 (", percent(prop.lda[2]), "%)", sep=""),
       color="Spezies", shape="Spezies") +
  scale_color_simpsons() +
  values=c(15,16,17)) +
  ggtitle("DAPC", subtitle = paste("a-score: ",score, sep = "")) +
```

```

theme(legend.text = element_text(size=12),
      plot.background = element_blank(),
      panel.background = element_blank(),
      panel.border = element_blank(),
      #panel.grid.major = element_blank(),
      #panel.grid.minor = element_line(size = 0.25, linetyp = "solid", colour = "lightgrey"),
      axis.line = element_line(colour = "black"),
      axis.text = element_text(size=12),
      legend.key = element_blank(),
      legend.title = element_blank(),
      plot.title = element_text(hjust = 0, vjust=2, size=14),
      plot.subtitle = element_text(hjust = 0, vjust=2, size=12))

```

i1

```

i2<-ggplot(as.data.frame(lda.result$x), aes(x=lda.result$x[,1], y=lda.result$x[,3])) +
  geom_point(aes(color=factor(ossa[[daten]])),size=5, alpha=0.7) +
  labs(x= paste("LD1 (", percent(prop.lda[1]), "%", sep=""),
        y= paste("LD3 (", percent(prop.lda[3]), "%", sep=""),
        color="Spezies", shape="Spezies") +
  scale_color_simpsons() +
  values=c(15,16,17)) +
  #ggtitle("", subtitle = paste("a-score: ",score, sep = "")) +
  theme(legend.text = element_text(size=12),
        plot.background = element_blank(),
        panel.background = element_blank(),
        panel.border = element_blank(),
        #panel.grid.major = element_blank(),
        #panel.grid.minor = element_line(size = 0.25, linetyp = "solid", colour = "lightgrey"),
        axis.line = element_line(colour = "black"),
        axis.text = element_text(size=12),
        legend.key = element_blank(),
        legend.title = element_blank(),
        plot.title = element_text(hjust = 0, vjust=2, size=14),
        plot.subtitle = element_text(hjust = 0, vjust=2, size=12))

```

i2

```

i3<-ggplot(as.data.frame(lda.result$x), aes(x=lda.result$x[,2], y=lda.result$x[,3])) +
  geom_point(aes(color=factor(ossa[[daten]])),size=5, alpha=0.7) +
  labs(x= paste("LD2 (", percent(prop.lda[2]), "%", sep=""),
        y= paste("LD3 (", percent(prop.lda[3]), "%", sep=""),
        color="Spezies", shape="Spezies") +
  scale_color_simpsons() +
  values=c(15,16,17)) +
  #ggtitle("", subtitle = paste("a-score: ",score, sep = "")) +
  theme(legend.text = element_text(size=12),
        plot.background = element_blank(),
        panel.background = element_blank(),
        panel.border = element_blank(),
        #panel.grid.major = element_blank(),
        #panel.grid.minor = element_line(size = 0.25, linetyp = "solid", colour = "lightgrey"),
        axis.line = element_line(colour = "black"),
        axis.text = element_text(size=12),

```

```

    legend.key = element_blank(),
    legend.title = element_blank(),
    plot.title = element_text(hjust = 0, vjust=2, size=14),
    plot.subtitle = element_text(hjust = 0, vjust=2, size=12))
i3

delt<-c(2)
a<-2
b<-c(1:nrow(ossa))
for (i in c(1:((nrow(ossa)-3)/3))) {
  a<-a+3
  delt<-c(delt,a)
}
del<-b[-delt]
txt<-c(ossa[d] %>% mutate_if(is.factor,as.character))
txt[[daten]][del]<-" "
compoplot(dapc.daten,
  n.col = 5,
  cleg = 0.9,
  cex.names = 0.7,
  cex.axis = 1,
  show.lab=T,
  lab = txt[[daten]],
  posi=list(x=-4,y=1.195),
  col=pal_simpsons(),
  txt.leg = colnames(dapc.daten))

LD_1<-paste("LD1 (", percent(prop.lda[1]), "%", sep="")
LD_2<-paste("LD2 (", percent(prop.lda[2]), "%", sep="")
LD_3<-paste("LD3 (", percent(prop.lda[3]), "%", sep="")

#3D Plot
fig<-plot_ly(x=lda.result$x[,1],
  y=lda.result$x[,2],
  z=lda.result$x[,3],
  colors=c("#FADF7CFF", "#82491EFF", "#24325FFF", "#B7E4F9FF", "#FB6467FF", "#526E2DFF", "#E762D7FF",
  "#E89242FF", "#FAE48BFF", "#A6EEE6FF", "#917C5DFF", "#69C8ECFF", "#000000FF"),
  type="scatter3d",
  mode="markers",
  color=factor(ossa[[daten]]),
  size = 5)
fig<-fig %>% layout(scene = list(
  xaxis = list(title = LD_1),
  yaxis = list(title = LD_2),
  zaxis = list(title = LD_3)))
fig<-fig %>% layout(legend = list(font = list(size = 10)))
fig<-fig %>% layout(legend = list(itemsizing = list(size = 10)))
fig

scatter(xval$DAPC, cex = 2, legend = TRUE,
  clabel = FALSE, posi.leg = "bottomleft", scree.pca = TRUE,
  posi.pca = "topleft", cleg = 0.75, xax = 1, yax = 2, inset.solid = 1

```